

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Estrategias bioanalíticas para estudios metalómicos en tratamientos
con cisplatino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estefanía Moreno Gordaliza

Directores

**María Milagros Gómez Gómez
Benito Cabañas Montalvo**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Estrategias bioanalíticas para estudios metalómicos en
tratamientos con cisplatino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Estefanía Moreno Gordaliza

Directores:

M^a Milagros Gómez Gómez

Benito Cañas Montalvo

Madrid, 2012



Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Dra. María Milagros Gómez Gómez, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid,

Dr. Benito Cañas Montalvo, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid,

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado “Estrategias bioanalíticas para estudios metalómicos en tratamientos con cisplatino” ha sido realizado bajo nuestra dirección por D^a Estefanía Moreno Gordaliza, constituyendo la Tesis Doctoral de la autora.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 22 de Marzo de 2012.

Fdo: Dra. María Milagros Gómez Gómez

Fdo: Dr. Benito Cañas Montalvo

A mis padres y a mis abuelos

Agradecimientos

El camino a recorrer para llevar una tesis a buen puerto puede ser largo y difícil y sin la ayuda y el apoyo de otras personas resultaría completamente imposible. Quisiera en estas líneas reconocer y agradecer a todas aquellas personas que me han servido de motor y soporte durante estos últimos años para ser capaz de realizar este trabajo y que han configurado quién soy.

En primer lugar, agradezco profundamente a mis directores de tesis, la Dra. Milagros Gómez y el Dr. Benito Cañas, por ser mis maestros y por haber sabido guiarme y orientarme, dándome la suficiente libertad y confianza para mi desarrollo personal y científico. Gracias por vuestros consejos y enseñanzas, por vuestro apoyo personal en el día a día, por creer en mí desde el primer instante y por darme la oportunidad de hacer y aprender tantas cosas. Y sobre todo, por ayudarme a alcanzar esta meta.

Agradezco asimismo al Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid por haberme permitido realizar la mayor parte de este trabajo en sus laboratorios. Dedico un especial agradecimiento a la Dra. María Antonia Palacios, quien una vez hizo plantearme si podría interesarme la investigación y quien desde entonces ha permanecido detrás ofreciéndome su cariño, apoyo e interés por mi vida. También agradezco a la Dra. Carmen Cámara que desde el principio me acogiera tan bien en su grupo de investigación y que durante estos años siempre me haya ofrecido sus mejores palabras y deseos, interesándose permanentemente sobre el transcurso de mi trabajo.

In addition, I wish to thank Prof. Dr. Michael Linscheid from Humboldt Universitaet zu Berlin for kindly giving me the opportunity to stay in his research group and to perform relevant and fruitful experiments for my thesis. Agradezco especialmente al Dr. Diego Esteban el haber sido un verdadero maestro desde mis comienzos, sus siempre valiosos consejos y sugerencias y su activa implicación y ayuda en los proyectos compartidos. A toda la familia Esteban-Fernández siempre agradeceré su amistad, generosidad y hospitalidad; y que consiguiesen que mi etapa en Berlín sea siempre recordada como una de las más felices de mi vida. I also thank the rest of my lab mates at Humboldt U. (Matthias, Ahmed, Freddy, Ivetta, Ulrike, Sebastian, Gunnar, Rajko, Violette) for their friendliness and hospitality, for making daily life easy and for arranging very nice barbecues on sunny days!

I would also like to thank Dr. Norbert Jakubowski at BAM Berlin for his permanent openness to participate with me in collaborative projects, for kindly giving me the opportunity to perform laser ablation experiments key for this thesis, and for always helpful scientific discussions and suggestions. Dr. Charlotte Giesen is gratefully acknowledged for her precious help in those laser ablation projects, for sharing with me all her knowledge and experience, for enjoyable and interesting discussions and, importantly, for becoming a good friend.

I also thank Dr. Christian Scheler and Dr. Karola Lehmann at Proteome Factory AG, Berlin, for their collaboration, their suggestions and their valuable assistance in those gel electrophoresis separations I

Agradecimientos

performed at their lab. I also thank Simone, Marion and Boris for their kindness. It was a great pleasure to meet you all.

Agradezco al Dr. Alberto Tejedor y al Dr. Alberto Lázaro del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por haber sido la piedra angular para aportar el punto de vista médico y bioquímico a esta tesis, ofreciendo una colaboración siempre enriquecedora y gratificante. Asimismo agradezco a la Dra. Sonia Camaño y a Blanca Humanes su inestimable colaboración en dichos proyectos y sus enseñanzas. Sin duda, las sesiones de tratamiento de las ratas y de extracción de riñones permanecerán por siempre entre mis recuerdos.

Sin embargo, donde he pasado la mayor parte de mi tiempo ha sido en el Departamento de Química Analítica de la UCM. Allí he tenido la ocasión de conocer a numerosas personas que me han servido de soporte técnico pero principalmente humano. En primer lugar, gracias a los que, con el tiempo, se fueron convirtiendo en mis tres pilares fundamentales: Ani, Soni y Pablo, por estar siempre a mi lado; porque hemos compartido momentos geniales y también muchos desahogos; y sobre todo, por regalarme su valiosa y sincera amistad, que sé que podré llevar conmigo más allá de esta etapa. Gracias también a Mariluz por su espíritu generoso y su permanente sonrisa que hace que sea tan agradecido trabajar con ella. A Teresa, por esas visitas mutuas que siempre me hacen desconectar y sonreír. A Susana, porque fue un soporte relevante y por discusiones siempre gratificantes. A Mabel, porque cuando se deja descubrir resulta ser una gran compañera y aún mejor persona. Al resto de mis compañeros de laboratorio y grupo que estuvieron y a los que están: Nuria, Nines, Raquel, Laura, Aline, Mer, Irene, María P., María S., Noe, Lucía, Soumaya, Edu, Karim, Jon, Rian, Christian, Jose, Juan Luis, Yolanda, Ana, Conchita, Marilyn, Zoyne, Daniela, Melissa, Erik, Héctor, Adriana, Rocío, Carmen... porque además de ciencia, hemos compartido risas, fiestas, cenas y muchos buenos momentos que siempre quedarán en el recuerdo. A Lola, Daniel y Vanesa porque siempre me alegra pararme en los pasillos para reírme con ellos. Y a mi amiga Sara, por introducirme al *modus operandi* de los geles, por nuestras largas conversaciones en el pasillo de Bioquímica y porque sé que puedo contar con ella.

También quiero agradecer a las personas ajenas a esto que son un soporte imprescindible. En la vida, sólo los verdaderos amigos son capaces de permanecer con el paso del tiempo. Gracias a María por ofrecerme esa verdadera amistad de tantos años, por ser un apoyo indispensable y por interesarse siempre por esta tesis, aunque llegara a convertirse en mi monotema. Por último, la familia siempre resulta el apoyo más importante y reconfortante de todos. Gracias a mis tíos y mis primos (los más cercanos y los más lejanos) porque tengo la fortuna de que estos sean un respaldo que siempre ha estado cerca y se ha preocupado por mí. Y finalmente, a mis padres y a mis abuelos, las personas que más quiero, que han determinado mi manera de ser, y quienes me han dado todo y me han enseñado las más importantes lecciones de vida, como qué significa el amor desinteresado y generoso o el espíritu de trabajo, esfuerzo y sacrificio.

A todos vosotros, muchas gracias.

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

El cisplatino es un compuesto antineoplásico que se ha aplicado con éxito desde los años 70 para el tratamiento de numerosos tumores, suponiendo entonces un verdadero hito en quimioterapia, y aún hoy en día empleándose en la mitad de las terapias contra el cáncer. Existen, sin embargo, ciertas complicaciones asociadas al tratamiento como la aparición de efectos secundarios de cierta gravedad, destacando la nefrotoxicidad, que suponen una limitación en la dosis administrable de cisplatino; y los efectos de resistencia intrínseca o desarrollada al fármaco de ciertos tumores. Ambos problemas suponen una disminución de la efectividad del tratamiento, y aunque se ha tratado de desarrollar otros fármacos con base platino y otros metales con propiedades mejoradas, cisplatino sigue siendo un compuesto irremplazable en terapias antitumorales.

Aunque es bien sabido que su diana farmacológica principal es el ADN, al que se coordina provocando distorsiones que resultan en la muerte celular por apoptosis o necrosis, el cisplatino presenta también una gran reactividad frente a otras biomoléculas, como las proteínas. Este tipo de interacciones son aún poco conocidas y pueden estar relacionadas tanto con su complicado mecanismo de acción antitumoral como con sus efectos secundarios y de resistencia, por lo que el estudio de estas interacciones podría contribuir a la comprensión de dichos mecanismos, y por tanto al diseño de terapias oncológicas más eficaces.

En esta tesis doctoral se han desarrollado metodologías analíticas basadas en separaciones electroforéticas multidimensionales, técnicas cromatográficas y en el empleo de espectrometría de masas atómica y molecular de alta sensibilidad, encaminadas a la especiación de Pt y, en particular, la identificación de complejos Pt-proteínas en muestras biológicas procedentes de modelos celulares y animales tratados con cisplatino.

En primer lugar, empleando ESI-LIT-MSⁿ y MALDI-TOF se evaluaron las aproximaciones *top-down* y *bottom-up* en espectrometría de masas para la caracterización de Pt-proteínas, examinando los tratamientos de muestra involucrados y los métodos de ionización y de fragmentación. Empleando un modelo de insulina incubada con el fármaco, se obtuvo una caracterización más extensa en el caso de la aproximación *bottom-up* implicando digestiones proteicas tripticas. Asimismo, empleando diversos modelos proteicos incubados con cisplatino se evaluaron las condiciones más adecuadas para la separación de Pt-proteínas mediante 2-DE. Además se desarrollaron métodos para su detección mediante LA-ICP-MS, directamente en el gel o previa transferencia a membranas de nitrocelulosa; y su posterior digestión enzimática en gel e identificación mediante nLC-ESI-MS/MS. Dada la problemática y la gravedad de los

efectos nefrotóxicos de cisplatino, la metodología se aplicó posteriormente para el análisis de complejos Pt-proteínas en células de túbulo proximal renal afectado, además de en muestras de suero sanguíneo de rata tras tratamientos con cisplatino. Esto permitió producir el primer mapa completo de distribución del Pt-proteoma en un gel 2D, en concreto para células RPTECs. Además se comprobó que existe cierta selectividad en la unión de cisplatino a dianas proteicas.

Por otro lado, para ahondar en la relación entre la distribución celular de cisplatino y sus efectos tóxicos, se ha desarrollado una metodología para la obtención de bioimágenes elementales de alta resolución mediante LA-ICP-(SF)-MS para la localización del Pt y otros metales de forma directa sobre láminas de riñón de ratas tras la administración del fármaco. La alta resolución (8 μm) y sensibilidad (LOD: 50 fg Pt) alcanzadas permitió determinar la acumulación primordial de Pt en segmentos S3 del túbulo proximal. Además se comprobó el efecto reductor en la acumulación celular de Cu y Zn ejercido por cisplatino.

Finalmente, se afrontó la evaluación de cilastatina como posible nefroprotector durante las terapias con cisplatino, en modelos celulares y animales, combinando el empleo de diversos ensayos bioquímicos y de técnicas de espectrometría de masas elemental (ICP-MS) para la determinación de platino en extractos citosólicos y de ADN de cultivos celulares, en extractos citosólicos de riñón animal y en suero sanguíneo. Además se realizaron estudios de especiación por SEC-ICP-MS en los extractos proteicos. Cilastatina se perfila como un candidato de acción específica sobre las células de túbulo proximal, sin perturbar la acción antitumoral de cisplatino.

ABSTRACT

The antineoplastic drug cisplatin has been successfully used since the 1970s for the treatment of numerous tumours, being then a real milestone in chemotherapy and still being present in half of cancer therapies. However, a number of complications can take place during these treatments, such as relatively severe side effects, like nephrotoxicity, which is a dose-limiting effect for cisplatin; and either intrinsic or developed resistance to the drug. Both problems represent a limitation to the effectiveness of the treatment. However, despite many efforts towards the development of alternative Pt/metal based drugs with improved properties, cisplatin is still an irreplaceable drug in chemotherapy.

Although DNA is considered to be the main pharmacologic target of cisplatin, suffering a well known structural distortion after their coordination, which results in cell death either by apoptosis or necrosis, a high reactivity towards other biomolecules such as proteins is also displayed by the drug. These interactions with proteins are still highly unknown and may be related to their complex cytotoxic mechanism of action as well as to the resistance and side-effects observed. For this reason, the study of the Pt-protein complexes formation could contribute to a better understanding of those mechanisms and therefore to the design of more effective cancer therapies.

Within this doctoral thesis, the development of analytical methodologies based on the use of multidimensional electrophoretic separations, chromatographic techniques and high sensitivity atomic and molecular mass spectrometry techniques has been tackled for the identification of Pt-protein complexes in biological samples from either cell or animal models treated with cisplatin.

First of all, by using ESI-LIT-MSⁿ and MALDI-TOF, the mass spectrometry-based top-down and bottom-up approaches were examined regarding their use for the characterization of Pt-proteins, evaluating the sample treatments involved as well as ionization and fragmentation methods. A more extensive characterisation was achieved with the bottom-up approach, involving tryptic digestions, by using an insulin model incubated with cisplatin. Moreover, several other protein models incubated with the drug were employed for the examination of the most appropriate conditions for the 2-DE separation of Pt-proteins. In addition to this, methodologies were developed for their detection by LA-ICP-MS, either directly on the gel or with a prior transfer to nitrocellulose membranes; and finally for their identification by in gel enzymatic digestion followed by nLC-ESI-MS/MS. Considering the problematic and severe nephrotoxic effects induced by cisplatin, the methodology has been applied to the analysis of Pt-protein complexes in damaged renal proximal tubule epithelial cells, in addition to rat serum

samples after cisplatin treatments. The first complete distribution map for Pt-proteome in a 2-DE gel was produced, in this case for RPTECs cells. Furthermore, it could be checked that some degree of selectivity does take place in the coordination of cisplatin to protein targets.

Moreover, for a deeper understanding of the connection between cisplatin cellular accumulation and its induced toxic effects, a methodology for high resolution elemental bioimaging by LA-ICP-(SF-)MS for the direct localization of Pt and other metals in kidney slices from rats treated with cisplatin was developed. The achieved high resolution (8 μm) and sensitivity (LOD: 50 fg Pt) in the images allowed disclosing a primary Pt accumulation in S3 segments from renal proximal tubules. On the other hand, a cisplatin-induced decrease in the cellular accumulation of Cu and Zn could be observed.

Finally, the protective effect of cilastatin against cisplatin-induced nephrotoxicity was demonstrated in both cell and animal models, by combining several biochemical and histopathological assays with the determination of total Pt by atomic mass spectrometry (ICP-MS) in cytosolic and DNA extracts from cell cultures, in cytosolic extracts from rat kidney and blood serum. Moreover, speciation analyses by SEC-ICP-MS were conducted in several protein extracts. As a result, cilastatin is outlined as an agent with protective specificity towards proximal tubule cells with no effect on cisplatin antitumor effect.

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. CISPLATINO.....	3
1.1. Administración, farmacocinética y reactividad del cisplatino.....	4
1.2. Mecanismo de acción de cisplatino.....	7
1.2.1. Interacción con biomoléculas de la sangre.....	7
1.2.2. Interacciones en el interior celular.....	8
1.2.2.1. Interacción con componentes celulares diferentes al ADN.....	10
1.2.2.2. Interacción con el ADN: la diana farmacológica de cisplatino.....	12
1.2.3. Respuesta celular al daño inducido por cisplatino en el ADN.....	15
1.2.3.1 Reconocimiento proteico de aductos Pt-ADN.....	16
1.2.3.2. Reparación de aductos Pt-ADN.....	17
1.3. Resistencia al tratamiento con cisplatino.....	18
1.3.1. Resistencia debida a la unión insuficiente al ADN.....	18
1.3.2. Resistencia tras la unión al ADN.....	20
1.4. Efectos secundarios. Nefrotoxicidad. Agentes nefroprotectores.....	21
1.4.1. Nefrotoxicidad.....	21
1.4.2 Estrategias nefroprotectoras.....	25
1.5. Terapias mejoradas basadas en fármacos de platino.....	27
2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN METALÓMICA.....	33
2.1. Metales en sistemas biológicos y metalómica.....	33
2.2. Estrategias generales en metalómica y problemática.....	35
2.3. Análisis de la composición elemental y técnicas de bioimagen en muestras biológicas.....	36
2.3.1. Determinación de contenidos totales elementales en muestras biológicas.....	36
2.3.2. Técnicas de bioimagen elemental en tejidos y células.....	39
2.4. Análisis de especiación de biomoléculas ligadas a metales.....	42

2.4.1. Espectrometría de masas molecular para la determinación estructural de los complejos metal-biomoléculas.....	44
2.4.1.1. Espectrometría de masas MALDI-MS.....	44
2.4.1.2. Espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS).....	46
2.4.1.3. Analizadores de masas de trampas de iones.....	48
2.4.1.4. Instrumentos para espectrometría de masas en tándem.....	51
2.4.1.5. Métodos de fragmentación de biomoléculas.....	53
2.4.1.6. Reconocimiento de especies modificadas con Pt por MS: el perfil isotópico.....	54
2.4.1.7. Aplicaciones de MALDI-MS y ESI-MS para el análisis directo de metalobiomoléculas.....	56
2.4.2. Técnicas acopladas de análisis en especiación.....	61
2.4.2.1. HPLC.....	62
2.4.2.2. CE.....	65
2.4.2.3. Electroforesis en gel (PAGE, IEF, 2-DE).....	66
2.5. Métodos de preparación de muestra para estudios de (metalo)proteómica.....	71
2.6. Aproximaciones proteómicas basadas en la espectrometría de masas para la caracterización de metaloproteínas	74
2.6.1. Aproximación “bottom-up”	75
2.6.2. Aproximación “top-down”	78
3. ARTÍCULO DE REVISIÓN: Trabajo 1. “Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs”	81
II. OBJETIVOS / AIMS.....	103
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	109
III.1. ESTRATEGIAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON CISPLATINO.....	111
Trabajo 2. “Top-down mass spectrometric approach for the full characterization of insulin-cisplatin adducts”	117

Trabajo 3. “ <i>Novel insights into the bottom-up mass spectrometry proteomics approach for the characterization of Pt-binding proteins: The insulin-cisplatin case study.</i> ”.....	137
III.2. METODOLOGÍAS BIOANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON CISPLATINO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMPLEJAS.....	157
Trabajo 4 “ <i>OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins</i> ”.....	163
Trabajo 5 “ <i>Characterization of Pt-protein complexes by nHPLC-ESI-LTQ MS/MS using a gel-based bottom-up approach</i> ”.....	175
Trabajo 6 “ <i>LA-ICP-MS and nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS for the analysis of cisplatin-protein complexes separated by two dimensional gel electrophoresis in biological samples</i> ”.....	195
III.3. APLICACIONES EN BIOMEDICINA: EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS NEFROPROTECTORAS EN TERAPIAS ANTITUMORALES CON CISPLATINO.....	233
Trabajo 7 “ <i>Cilastatin reduces cisplatin-induced nephrotoxicity</i> ”.....	239
Trabajo 8 “ <i>Protective effect of cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats</i> ”.....	253
III. 4. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE BIOIMAGEN ELEMENTAL EN RIÑÓN TRAS TRATAMIENTOS CON CISPLATINO.....	273
Trabajo 9 “ <i>Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies</i> ”..	277
IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....	289
V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	311
VI. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS / SUGGESTIONS FOR FUTURE RESEARCH.....	317
VII. BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES.....	321
VIII. ANEXO.....	345
Trabajo 10 “Estrategias bioanalíticas en estudios metalómicos de fármacos de platino”.....	347

ABREVIATURAS

2-DE: Electroforesis bidimensional

A: Adenina

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AE: Intercambio aniónico

Ala: Alanina

APS: Persulfato amónico

Arg: Arginina

ARN: Ácido ribonucleico

Asp: Ácido aspártico

ATP: Adenosín trifosfato

ATP7A/ATP7B: ATPasa transportadora de cobre α/β

AUC: Área bajo la curva

BME: β -mercaptoetanol

BN-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida azul nativa

BSA: Albúmina de suero bovino

BUN: Nitrógeno ureico en sangre

C: Citosina

CA: Anhidrasa carbónica

CaM: Calmodulina

CBB: Azul de coomassie brillante

CD : Dicroísmo circular

CE: Electroforesis capilar

CEC: Electro cromatografía capilar

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

CHCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

CID: Disociación inducida por colisión

CPK: Modelo molecular tridimensional de bolas de llenado espacial

Cps: Cuentas por segundo

CTR1: Proteína transportadora de cobre 1

Cys: Cisteína

CYT C: Citocromo c

CZE: Electroforesis capilar de zona

dAMP: 2'-Desoxiadenosina 5'-monofosfato

dGMP: 2'-Desoxiguanosina 5'-monofosfato

DHB: Ácido 2,5-dihidroxibenzoico

DHP-I: Dehidropeptidasa I renal

DIN: Nebulizador de introducción directa

DOTA: Ácido 1,4,7,10-tetraazacyclododecano-1,4,7,10-tetraacético

DTE: Ditioeritritol

DTT: Ditiotreititol

ECD: Disociación por captura electrónica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMA: Agencia europea del medicamento

ESI: Ionización por electronebulización o electrospray

ETD: Disociación por transferencia electrónica

ETV: Vaporización electrotérmica

FA: Ácido fórmico

FDA: Agencia de medicamentos y alimentos (EEUU) (*Food and Drug Administration*)

FIA: Análisis de inyección en flujo

FT (ICR): Analizador de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier

FT-IR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

FWHM: Anchura total a mitad de altura de pico

G: Guanina

GE: Electroforesis en gel

GFR: Tasa de filtración glomerular

Glu: Ácido glutámico

GSH: Glutación (reducido)

GSSG: Glutación (oxidado)

GSTs: Glutación S-transferasas

HABA: Ácido 2-(4-hidroxifenilazo)-benzoico

Hb: Hemoglobina

hCTR1: Proteína transportadora de cobre 1 humana

HE: Hematoxilina-eosina

HeLa: Línea celular humana inmortal de cáncer cervical

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

HIFU: Ultrasonidos focalizados de alta intensidad

HILIC: Cromatografía de interacción hidrofílica

His: Histidina

HMG: Grupo de alta movilidad

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia

HSA: Albúmina de suero humano

HSP: Proteína de choque térmico

IAA: Yodoacetamida

ICP: Plasma de acoplamiento inductivo

ICP-AES: Espectroscopia de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

ICR: Resonancia ciclotrónica de iones

IE: Cromatografía de intercambio iónico

IEF: Isoelectroenfoque

Ile: Isoleucina

IPG: Gradiente inmovilizado de pH

LA: Ablación láser

LC: Cromatografía de líquidos

Leu: Leucina

LIT o LTQ: Trampa de iones lineal

LMD: Microdissección láser

LSB: Tampón de muestra de Laemmli

Lys: Lisina

MALDI: Ionización-desorción por láser asistida por una matriz

MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MATE: Extrusión de multifármacos y de compuestos tóxicos

MC: Multicollector de iones

MDR: Multirresistencia a fármacos

MEKC: Cromatografía micelar electrocinética

Met: Metionina

MMR: Reparación de apareamientos erróneos

MRP-1/2: Proteína de multirresistencia a fármacos 1/2

MS: Espectrometría de masas

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

MT: Metalotioneína

MudPIT: Tecnología de identificación de proteínas multidimensional

MYO: Mioglobina

NAA: Análisis por activación neutrónica

NC: Nitrocelulosa

NER: Reparación por excisión de nucleótidos

NHE1: Proteína intercambiadora de sodio/potasio

nrSDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes no reductoras con dodecilsulfato sódico.

OCT (1/2): Transportador de cationes orgánicos (isoformas 1/2)

OmpA: Proteína de membrana externa A

OS: Estrés oxidativo

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PDA: Diacrilamida piperazina

Phe: Fenilalanina

PIXE: Emisión de rayos X inducida por micropartículas

PMF: Identificación de proteínas por análisis de la huella peptídica

PSD: Decaimiento post-fuente, *Post Source Decay*

PTM: Modificación postransduccional

Q: Analizador de cuadrupolo

QIT o IT: Trampa de iones cuadrupolar o tridimensional

RAPTA: Compuestos de Ru(II) de fórmula general $[(n_6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})_2(\text{pta})]$, X= Cl/dicarboxilato quelatante

RE: Retículo endoplasmático

RMN: Resonancia magnética nuclear

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RP: Cromatografía de fase inversa

RPTECs: Células epiteliales de túbulo proximal renal

RT: Temperatura ambiente

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaños

Ser: Serina

SF: Analizador de doble sector

sIEF: Isoelectroenfoque en disolución

SIMS: Espectrometría de masas de ión secundario

SOD: Superóxido dismutasa

SPE: Extracción en fase sólida

SXRF: Fluorescencia de rayos X con radiación de sincrotrón

T: Timina

TBP: Tributylfosfina

TCEP: Triscarboxietilfosfina

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TF: Transferrina

TFA: Ácido trifluoroacético

Thr: Treonina

TLS: Reparación por síntesis de translesión

TOF: Analizador de tiempo de vuelo

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

Trp: Triptófano

TrxR: Tiorredoxina reductasa

Tyr: Tirosina

Ub: Ubiquitina

UV-VIS: Espectroscopia ultravioleta-visible

Val: Valina

XAS: Espectroscopia de absorción de rayos X

XRF: Fluorescencia de rayos X

Zpp: Péptido de los dedos de Zn

I. INTRODUCCIÓN

1. CISPLATINO

El *cis*-diaminodicloroplatino (cisplatino, *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂) constituye el primer compuesto metálico introducido en terapias antitumorales de forma global. Es un complejo plano cuadrado de Pt(II) con dos ligandos cloruro y dos ligandos amino en posición *cis*, tal y como se aprecia en la Figura 1.

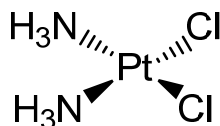


Figura 1. Estructura del cisplatino

Se trata de un sólido amarillo brillante, cuya síntesis fue propuesta por Peyrone en 1845,¹ tomando el nombre de cloruro de Peyrone, siendo su estructura dilucidada por Werner en 1893.² Sin embargo, no fue hasta 1965 cuando Barnett Rosenberg y col. descubrieron de forma accidental sus propiedades.³ Durante el estudio del efecto de los campos eléctricos en el crecimiento y división celular sobre *E. coli*, empleando electrodos de platino, observaron que las bacterias adoptaban formas alargadas filamentosas, lo que indicaba que no se producía su división. Se postuló entonces que se podrían estar formando ciertos complejos de platino (entre ellos cisplatino) como productos de hidrólisis en el medio de cultivo, que pudieran afectar al crecimiento celular. En 1969 se publicaron los resultados de un estudio posterior sobre el efecto de diversos complejos de platino sobre tumores implantados en ratones, demostrando la especial efectividad de cisplatino en el tratamiento de células de sarcoma 180 y leucemia L1210.⁴ Sin embargo el isómero *trans*- (transplatino, *trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂) resultó poseer una actividad antitumoral escasa. Dado el carácter prometedor de cisplatino, en 1971 se realizaron los primeros ensayos clínicos con el mismo. Finalmente, en 1978 se obtuvo la autorización por la autoridad reguladora estadounidense, FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos, *Food and Drug Administration*) para su uso como fármaco antitumoral, siendo comercializado bajo el nombre de platinol[®] por Bristol-Myers. Actualmente sigue empleándose a nivel mundial.

El redescubrimiento del cisplatino supuso la apertura de la actividad enfocada a la búsqueda de fármacos antitumorales al campo de la química inorgánica, ya que hasta entonces había estado limitada a los dominios de la química orgánica y de los productos naturales. Estos estudios dieron paso a la investigación de otros complejos de Pt⁵ (como se verá en la sección 1.5.)) o incluso de otros metales como Ru,⁶ Au,⁷ Ga⁸ o Ti,⁹ con objeto de mejorar las terapias antitumorales.

Durante las últimas décadas, el cisplatino se ha aplicado con éxito para el tratamiento de numerosos tumores bien solo o en combinación con otros fármacos antineoplásicos, como: inhibidores de la topoisomerasa II (doxorubicina, etopósido, mitomicina, bleomicina y epirubicina); mostazas (ciclofosfamida, melfalán e ifosfamida); antimetabolitos (ciclogemcitabina, 5-fluorouracilo y metotrexano); alcaloides de la vinca (vinblastina y vinorelbina) o taxoles (paclitaxel).¹⁰ Sin embargo, es necesario reducir los efectos secundarios asociados al tratamiento con cisplatino, tales como nefrotoxicidad, ototoxicidad, neuropatías, náuseas y vómitos;¹¹ que limitan las dosis administrables del fármaco; y los problemas relacionados con la resistencia intrínseca o adquirida de ciertos tumores al cisplatino,¹¹ en los que se profundizará en la sección 1.3. Es destacable el hecho de que, a pesar de los problemas asociados al tratamiento con cisplatino, aún sigue empleándose en casi la mitad de las terapias antitumorales,¹⁰ poniendo de manifiesto su relevancia y su carácter todavía insustituible. Actualmente se emplea para el tratamiento de cáncer de: testículos, ovarios, vejiga, cabeza y cuello, esófago, colon, estómago, mama, pulmón; y de melanomas, linfomas y mielomas.^{5, 12}

1.1. Administración, farmacocinética y reactividad del cisplatino

El cisplatino suele administrarse por vía intravenosa. Las dosis habituales de cisplatino oscilan entre 20 y 140 mg m⁻² (calculado sobre el área superficial corporal del paciente) según el tipo de cáncer, y puede administrarse como una dosis única, por inyección de un bolo, o infusión a lo largo de un periodo de horas.¹³ Una pauta frecuente es la administración de un total de 5 dosis, divididas en ciclos, que se repiten cada tres semanas. Otra alternativa menos usual es la introducción por vía intraperitoneal.¹⁴ Durante estos tratamientos, con objeto de disminuir la nefrotoxicidad del cisplatino, los pacientes son exhaustivamente hidratados previamente a la administración, que suele realizarse con el fármaco preparado en una disolución salina conteniendo 0,9 % NaCl.

Tras la entrada del cisplatino por vía intravenosa y su incorporación al torrente sanguíneo, la ruta principal de excreción del fármaco es la orina, a través de ultrafiltración renal del fármaco libre, lo cual está asociado con la mencionada nefrotoxicidad. Sin embargo, no es detectable significativamente en las heces. La vida media para la fase rápida de eliminación del cisplatino en plasma es de 30 min. Entre un 10 y un 40 % del compuesto es eliminado por la orina durante las primeras 24 h tras una sola inyección o tratamientos prolongados de 40 a 140 mg m⁻². Una segunda fase de excreción lenta tiene lugar con una vida media de entre 2 y 5 días. En cuanto a las especies eliminadas justo después de la administración, correspondientes al

cisplatino ultrafiltrable, se encuentran: el cisplatino intacto, su monoacuo complejo, el complejo $cis-[Pt(NH_3)_2Cl(creatinina)]^+$, y aductos de cisplatino con urea y con ácido úrico.¹⁵ El cisplatino no excretado interaccionará con biomoléculas y se transportará por el organismo incorporándose a las células, provocando la muerte celular, en principio, en las que son cancerígenas. El platino sufre una acumulación especialmente elevada en hígado, riñón y próstata, y en menor extensión, en intestino, corazón y cerebro, pudiendo detectarse en tejidos más del 5 % del Pt administrado hasta once meses después del tratamiento.¹⁶ Una vez que ha evolucionado por vía celular, puede excretarse también como un metabolito, a través del hígado.

Para explicar los complejos procesos de transporte, acumulación, eliminación y su capacidad de interacción con biomoléculas, que justificará su mecanismo de acción citotóxica, es necesario comprender la reactividad del platino y por ende, del cisplatino. En primer lugar, en términos generales, el platino forma complejos de coordinación en disolución acuosa, y por extensión en medios biológicos, siendo los compuestos más frecuentes los que presentan estados de oxidación II y IV. En estado de oxidación II, generalmente da lugar a complejos tetracoordinados de geometría plano-cuadrada, dado que presenta un sistema de electrones d^8 . Es de destacar el complejo $[PtCl_4]^{2-}$, que tiene gran relevancia en química preparativa y se hidroliza fácilmente en agua, produciendo $[Pt(H_2O)Cl_3]^-$ y $[Pt(H_2O)_2Cl_2]$. Existen numerosos complejos neutros con estequiometría $[PtXYLL']$, donde X e Y son aniones de tipo haluro, carboxilato, hidruro, alquilo, arilo; y L y L' son ligandos neutros, de tipo amoniacal, amina, fosfina, etc. Por otro lado, cuando el Pt se encuentra en estado de oxidación IV, forma complejos octaédricos, hexacoordinados, presentando un sistema de electrones d^6 . En general, todos estos complejos de Pt (II o IV) pueden considerarse de una elevada estabilidad termodinámica y relativa inercia cinética.

Considerando la estructura del cisplatino (Figura 1), éste consta de dos ligandos “fijos” (NH_3) y dos ligandos “salientes” (Cl^-), siendo los últimos susceptibles de ser sustituidos por otros ligandos con cierta facilidad. Por esta razón, el cisplatino puede experimentar reacciones de hidrólisis en medio acuoso,¹⁷⁻¹⁹ intercambiando los Cl^- por moléculas de agua, secuencialmente, como se aprecia en la Figura 2. El ataque de una primera molécula de agua sobre el complejo inicial (1), con la consiguiente pérdida de un Cl^- , da lugar al derivado monoacuo- (2), en una reacción de pseudo-primer orden con una vida media para su formación de 120 min.²⁰ A su vez, la especie monoacuo- está en equilibrio con el correspondiente monohidroxo- derivado (4), $[Pt(NH_3)_2Cl(OH)]$, siendo el pK_{a1} para la desprotonación de 6,41. Posteriormente, se produce el intercambio del ligando Cl^- restante por una segunda molécula de agua, dando lugar al diacuo-complejo (3), que por sucesivas pérdidas de protones, está en equilibrio con el correspondiente

dihidroxo complejo (6), con pK_{a2} y pK_{a3} de 5,37 y 7,21, respectivamente.¹² También sería posible la formación de complejos de platino multinucleares con unidades $[Pt(NH_3)]^{2+}$ enlazadas por puentes hidroxilo (especies μ -hidroxilo) (7), aunque en sistemas biológicos no se detectan dados los bajos niveles de cisplatino farmacológicos.

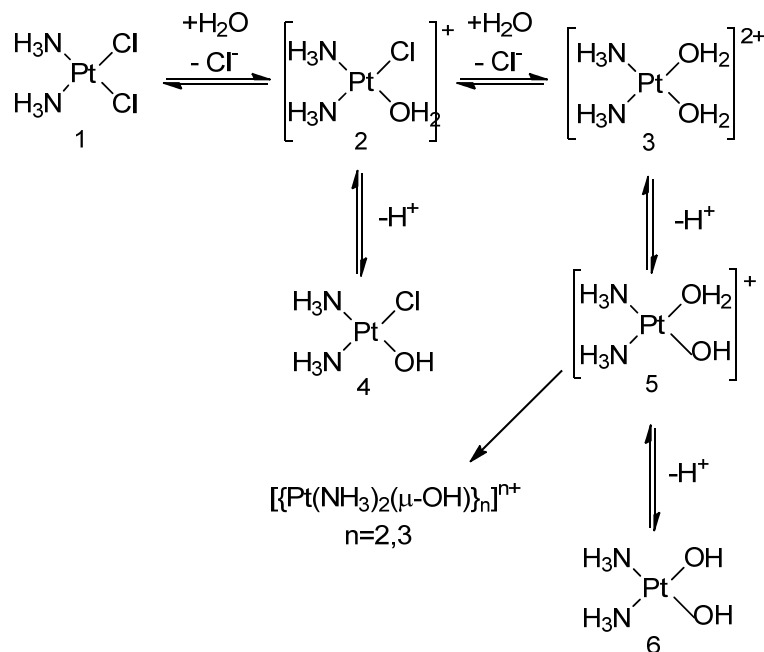


Figura 2. Hidrólisis del cisplatino en medio acuoso.

Por otro lado, considerando su carácter de ácido blando según la clasificación de Pearson, el Pt(II) tendrá una gran tendencia a coordinarse a ligandos con carácter básico blando con átomos dadores de electrones tales como S, Se, P, As, e incluso N.²¹ Estos son constituyentes de biomoléculas como el ADN (la diana farmacológica de cisplatino) o las proteínas, con los cuales podrá coordinarse experimentando reacciones de sustitución de sus ligandos. Particularmente, en el caso de las proteínas, es de esperar que el Pt (II) presente una gran afinidad principalmente por los grupos tiol presentes en las cisteínas (Cys), tioéteres como el residuo de la metionina (Met) y también por N- dadores como el residuo de histidina (His). Dado que H_2O es mejor ligando saliente que el OH^- o el Cl^- , las especies más reactivas de cisplatino con otros bioligandos serán sus acuocomplejos frente a los hidroxocomplejos (aunque, al estar en equilibrio, se considerarán indistintamente) o al cisplatino intacto. Dado el carácter lábil de los dos ligandos cloruro, es de esperar que el Pt pueda coordinarse de forma bidentada, cuando el entorno lo haga posible, a los ligandos biológicos, manteniendo sus dos ligandos NH_3 . Sin embargo, en algunos casos es de esperar que debido al intenso efecto trans que producen los ligandos dadores de electrones por S, pueda incluso llegar a perder sus ligandos originales NH_3 y tetracoordinarse como en el caso de proteínas con entornos ricos en Cys.²²

1.2. Mecanismo de acción de cisplatino

1.2.1. Interacción con biomoléculas de la sangre

El cisplatino que entra en el torrente sanguíneo, tras su administración, se encuentra en un medio con un pH alrededor de 7,4 y un contenido en Cl^- de aproximadamente 100 mM. En esas condiciones salinas, el equilibrio de hidrólisis está desplazado mayoritariamente hacia la forma intacta del fármaco, existiendo también una pequeña fracción de forma hidrolizada, que al pH de la sangre se presenta de manera predominante como el monohidroxo complejo. Dada la afinidad del cisplatino por los ligandos dadores de electrones, como se ha expuesto anteriormente, en la sangre interacciona extensamente con proteínas, quedando tan sólo un 10% del fármaco libre 24 horas después de su administración.²³

El cisplatino se une con gran afinidad a la hemoglobina (Hb) contenida en las células rojas.²⁴ Estudios realizados con concentraciones terapéuticas de cisplatino, han demostrado que se forman aductos $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-Hb}$, en los que parece tener lugar la pérdida del grupo hemo. Si así fuese, cabría esperar cierto descenso en la capacidad de transporte de O_2 de la Hb.

Por otra parte, la albúmina (HSA), que es la proteína más abundante del plasma sanguíneo, presenta una gran afinidad por cisplatino. Se ha demostrado que el Pt se une principalmente a los restos Met (Met 298) formando quelatos-N,S y a la Cys 34 libre a través de S.²⁵ Además se ha propuesto su unión a otros grupos como histidina (His), tirosina (Tyr) o ácido aspártico (Asp).²⁶ Recientemente se ha postulado que también podría entrecruzar los residuos His 67 del dominio I y el His 247 del dominio II en HSA, a través de los anillos imidazol, ocupando de esta forma el sitio principal de unión del Zn en la proteína, como puede observarse en la Figura 3.²⁷ Además podría formar dímeros proteicos, posiblemente relacionados con la inducción de la ruptura de puentes disulfuro formados por residuos Cys.²⁵

Otra proteína presente en el plasma con gran capacidad de coordinarse a Pt (II) es la transferrina (TF), para la cual se han propuesto como puntos de coordinación treonina (Thr), ácido glutámico (Glu) y Met.^{26, 28} En este caso se ha observado que el Fe unido a la proteína no se ve desplazado por el Pt, ya que los sitios de unión a ésta parecen ser diferentes, pudiendo incluso TF conservar su función biológica de transporte de hierro.²⁹ Este hecho podría suponer que su unión a la TF podría asistir en la llegada del fármaco a las células tumorales, que suelen desarrollar entornos altamente vascularizados y presentan una alta demanda de Fe. Otras proteínas como la α -2-macroglobulina, la α -1-antitripsina o las apolipoproteínas A1 y A2 han sido también propuestas como posibles ligandos para el cisplatino.²⁶

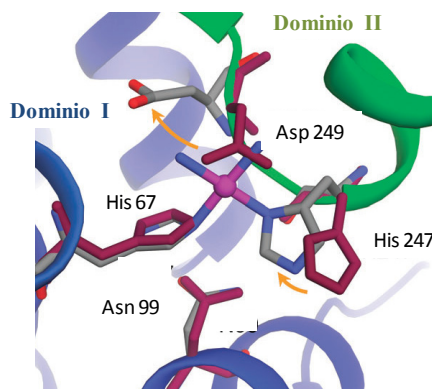


Figura 3. Propuesta estructural para la unión de cisplatino a HSA, entrecruzando los dominios I y II a través de la coordinación a His 67 e His 247. Adaptado de Hu y col. (2011)²⁷

1.2.2. Interacciones en el interior celular

Tras la distribución por todo el organismo a través de la sangre, el cisplatino es capaz de introducirse en las células para ejercer su acción antitumoral. Sin embargo, el mecanismo de entrada a la célula no está totalmente dilucidado. En un principio, considerando la acumulación lineal de cisplatino con el tiempo observada en modelos celulares y animales,^{30, 31} se pensó durante muchos años que el principal mecanismo se debía a un proceso de difusión pasiva, en el que las formas neutras dicloro y monohidroxo, más lipofílicas que las especies cargadas, pudieran adentrarse con más facilidad atravesando la membrana celular lipídica. Sin embargo, en los últimos años se apunta a que una parte considerable del cisplatino además podría entrar y salir de la célula mediante diversos transportadores, incluyendo mecanismos de transporte activo dependientes de ATP.³² En particular, se ha propuesto en su entrada a la célula la participación de los transportadores de cationes orgánicos (OCTs),³³⁻³⁵ de la proteína transportadora de cobre CTR1;³⁶⁻³⁹ de procesos dependientes de sodio,⁴⁰ aun sin dilucidar; así como rutas endocíticas, en particular de macropinocitosis.⁴¹ En la salida celular de cisplatino tienen un papel relevante los transportadores de cobre ATP7B y ATP7A⁴²⁻⁴⁵ (a través de secuestro vesicular)⁴⁶; además de proteínas de multirresistencia a fármacos (MDR), participantes en la eliminación de xenobióticos, como la MRP2.⁴⁷ Esto pone de manifiesto la relación existente entre el transporte de cobre y cisplatino, los cuales pueden reducir mutuamente sus niveles; desencadenar la degradación y deslocalización de CTR1 y producir resistencia cruzada.⁴⁸ Es relevante destacar que la implicación de estos transportadores de carácter proteico está relacionada con la capacidad de interacción y coordinación del cisplatino a estas proteínas, como en el caso extensamente estudiado de CTR1, que presenta un entorno rico en metioninas en su extremo N-terminal, a las que puede coordinarse el platino.^{39, 49-53}

Una vez en el interior celular, el cisplatino se encuentra en un medio donde los niveles de Cl^- se ven reducidos considerablemente, pudiendo oscilar entre 4 y 12 mM.⁵⁴ De esta forma, el equilibrio de hidrólisis para el cisplatino está considerablemente desplazado hacia las formas hidrolizadas. En las condiciones fisiológicas citoplasmáticas, los productos predominantes de hidrólisis son: el derivado monohidroxilado y el derivado monohidroxi-monoacuo.⁵⁵ El interés de estos procesos reside en que los productos de hidrólisis son altamente activos (especialmente los acuocomplejos) y reaccionan rápidamente con diferentes nucleófilos intracelulares. De hecho, en estudios efectuados en líneas de células tumorales expuestas a cisplatino se estimó el $t_{1/2}$ de su desaparición en alrededor de 75 min, sin que pudiesen detectarse sus productos de hidrólisis, poniendo de manifiesto su inmediata reacción con biomoléculas celulares.⁵⁶ La Figura 4 resume los principales mecanismos de entrada y salida de cisplatino en la célula y las reacciones principales que tienen lugar en su interior, en las que se profundizará posteriormente.

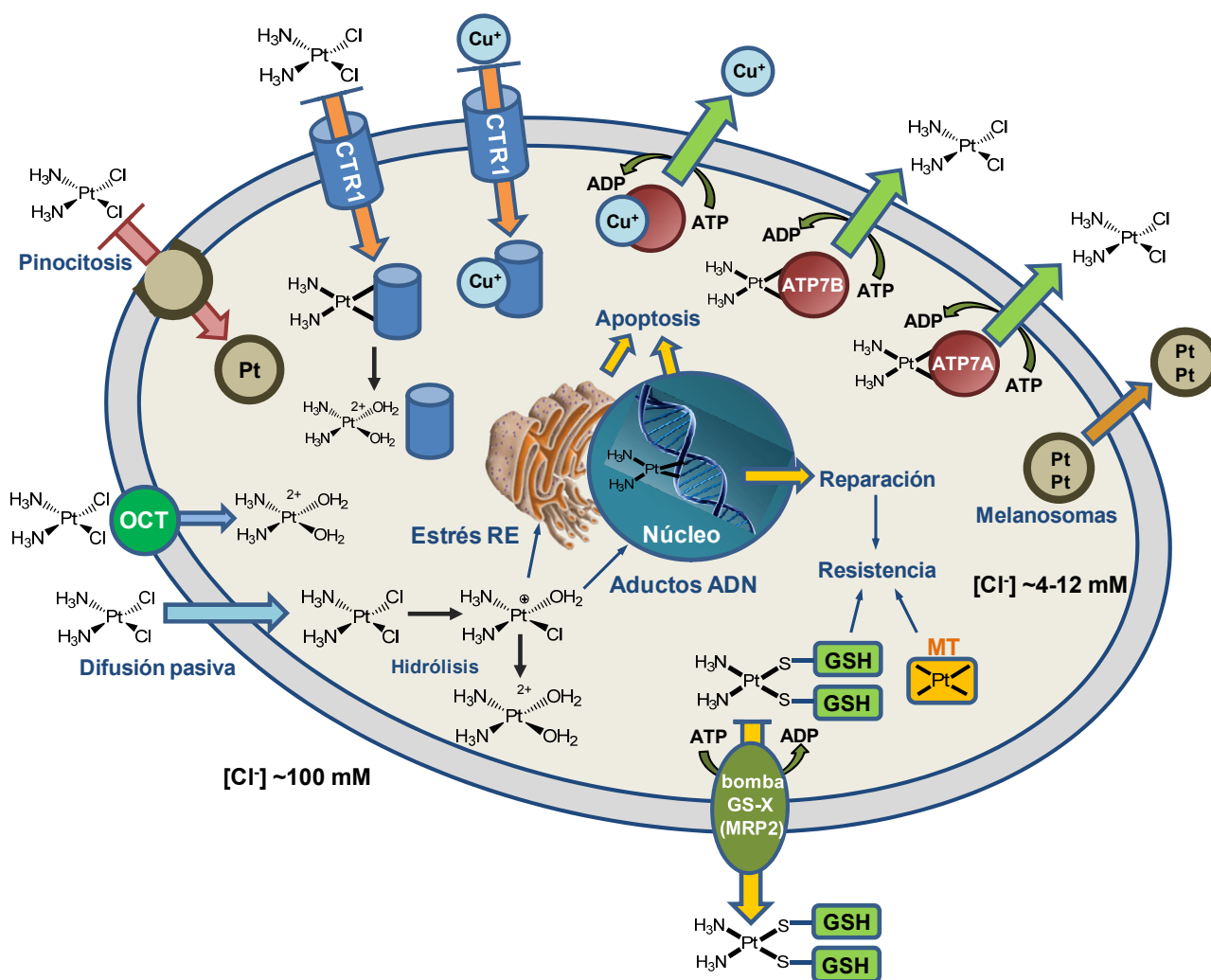


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos propuestos de entrada y salida de cisplatino de la célula y de los procesos reactivos relevantes asociados a su mecanismo de acción y de resistencia que tienen lugar en su interior.

1.2.2.1. Interacción con componentes celulares diferentes al ADN

Al atravesar la bicapa lipídica de la membrana plasmática, el cisplatino puede unirse a proteínas de membrana, como es el caso de la OmpA⁵⁷, además de los transportadores proteicos anteriormente mencionados. Por otro lado, la unión propuesta a la proteína intercambiadora de Na^+/K^+ (NHE1) situada en la membrana puede producir una disminución del pH intracelular, aumentar la fluidez de la membrana y promover la apoptosis.⁵⁸ Aunque la interacción entre el cisplatino y las proteínas de membrana es preferente con respecto a los fosfolípidos,⁵⁹ la unión débil y reversible a estos, de carácter fundamentalmente electrostático a través de sus cabezas cargadas negativamente con derivados de cisplatino cargados positivamente, produce cambios estructurales en la membrana que se traducen en alteraciones de propiedades celulares relevantes como la fluidez y la permeabilidad.⁶⁰ El cisplatino también podrá unirse reversiblemente a la fosfatidilserina en la membrana plasmática.⁵⁹ Además es capaz de alterar el citoesqueleto celular, debido a su capacidad de unión a la F-actina y la G-actina, favoreciendo la despolimerización de los microfilamentos.^{61, 62} Asimismo puede inhibir el proceso de la polimerización de las tubulinas a microtúbulos.⁶³ Por otro lado, el platino también podrá coordinarse a fosfatos y carbonatos⁶⁴ presentes en el citosol e incluso al ARN,⁶⁵ aunque esta interacción no tiene efectos citotóxicos tan significativos como los causados sobre el ADN en la célula.

A nivel mitocondrial, también puede impedir sus funciones, al inducir cambios en la permeabilidad de su membrana.⁶⁶ El Pt (II) podrá coordinarse a múltiples componentes citoplasmáticos que contengan grupos nucleófilos, como péptidos y proteínas (preferentemente con grupos tiol, como los que presentan las metalotioneínas⁶⁷ (6 kDa) (MT) y el tripéptido glutatión⁵⁶ (GSH), que tendrán gran afinidad por el fármaco y presentarán un papel relevante en los procesos de resistencia, como se comentará en la sección 1.3. Sin embargo, ciertos estudios muestran que dos tercios de los aductos de platino formados al incubar extractos celulares con cisplatino presentan pesos moleculares superiores a 30 kDa.⁶⁸ La importancia de la interacción de cisplatino con las proteínas radica en que como consecuencia, puede verse alterada su actividad, en el caso de enzimas o receptores u otras proteínas. Por ejemplo, el cisplatino puede unirse irreversiblemente a la tiorredoxina reductasa (TrxR), una enzima fundamental en el sistema regulador disulfuro/ditio, y como consecuencia inactivarla.⁶⁹

En el caso de la ubiquitina (Ub), también se ha demostrado su unión a cisplatino, tradicionalmente propuesta a su Met 1,⁷⁰⁻⁷² aunque recientemente se ha sugerido la unión principal en estado nativo a Thr 12 y Thr 14.⁷³ Esta interacción podría inhibir la ruta Ub-proteasoma de degradación selectiva de proteínas celulares, pudiendo conducir a la muerte

celular.⁷⁴ Cabe destacar que el fármaco también inhibe la chaperona HSP 90 (*heat shock protein*), bloqueando su sitio de unión al ATP en el C-terminal, y por tanto alterando su función en el plegamiento de proteínas.⁷⁵ También se ha comprobado la unión de cisplatino a las proteínas con dedos de zinc (*Zinc finger proteins*), cuya estructura se estabiliza a través de la coordinación a átomos de zinc, y que se unen al ADN e inician la expresión génica en la célula. Por ejemplo, el cisplatino se une al péptido zpp, que es el dominio que se une al ADN en la ADN-polimerasa- α , al igual que en el caso de ADN-polimerasa I, inhibiendo su actividad. El zpp contiene cuatro residuos cisteína, que se unen a zinc como tiolatos, con una geometría tetraédrica. Dos de estos residuos están situados cerca del amino terminal y los otros dos cerca del extremo carboxílico. El Pt^{2+} se coordina al péptido desplazando al Zn^{2+} . En un primer instante, se sitúa en la región C-terminal y el Zn se mantiene en el N-terminal, pero en una segunda etapa, se produce la pérdida del átomo de Zn y el Pt se tetracoordina al péptido.^{76, 77} Dado que la estructura del péptido se ve alterada tras la reacción con cisplatino, puede también verse afectada la capacidad de unión de este tipo de proteínas al ADN, e incluso ser inactivadas.⁷⁸

Se ha demostrado además la capacidad de unión de cisplatino a otras proteínas celulares modelo, tales como superóxido dismutasa (SOD), la cual presenta como sitio primario de unión la His 19, en este caso por encima de otros grupos con azufre como la Met 115 o la Cys 6, que probablemente estén impedidos estéricamente y sobre las demás Cys, que están involucradas en la formación de puentes disulfuro.⁷⁹ Por otro lado, el citocromo C (CYT C), situado en las mitocondrias e involucrado en la cadena de transporte de electrones y en el proceso de señalización apoptótica, también resulta un posible objetivo de cisplatino.⁸⁰ De hecho su Met 65 parece ser el sitio preferencial de coordinación al metal.⁸¹ También se ha estudiado la reacción de la mioglobina (MYO) (una proteína transportadora de Fe y de oxígeno a nivel muscular, equivalente a hemoglobina) con cisplatino y se ha propuesto que se coordine a través de sus residuos His 116 e His 119.⁸²

Otra proteína que se ha demostrado que puede sufrir cambios debido a su interacción con cisplatino es la calmodulina (CaM). Sobre ésta, el platino es capaz de coordinarse fundamentalmente sobre residuos Met formando entrecruzamientos en la proteína, y perdiendo en el proceso todos sus ligandos originales, debido al gran efecto *trans* inducido.^{83, 84} En condiciones de exceso de cisplatino, pueden encontrarse otros residuos reactivos como Asp o Glu que puedan coordinarse asimismo a Pt. Como consecuencia de esta interacción, se produce una inhibición de la actividad de la CaM, que actúa como un regulador en la transducción de la señal de calcio en la célula.⁸⁵

Sin embargo, en la mayoría de los casos mencionados, la determinación de dianas proteicas celulares se basa en estudios *in vitro* con proteínas estándar modelo, fuera de los complejos entornos biológicos. No obstante, recientemente en modelos de *E. coli*^{86, 87} se encontraron diversas dianas proteicas platinadas como consecuencia de la exposición de las bacterias a cisplatino, donde se identificaron hasta un total de 45 proteínas, incluyendo algunas que se unen al ADN, diversas enzimas, algunas involucradas en la síntesis de proteínas, transportadores y factores de respuesta a estrés. Además numerosas proteínas ven modificada su expresión como respuesta al estrés inducido por cisplatino.⁸⁷ Sin embargo existe aún un gran nivel de desconocimiento acerca de las proteínas que se ven alteradas durante el tratamiento con cisplatino, bien por su interacción directa con el fármaco o bien por su desregulación, y como consecuencia las implicaciones biológicas derivadas.

1.2.2.2. Interacción con el ADN: la diana farmacológica de cisplatino

Teniendo en cuenta la elevada afinidad de cisplatino hacia la multitud de bioligandos intracelulares que encuentra a su paso, no es de extrañar que tan sólo alrededor de un 1 % del cisplatino intracelular interaccione con el ADN.⁸⁸ El ADN se considera la principal diana farmacológica del cisplatino, con el cual forma aductos que causan una distorsión y un daño en la doble hélice del ADN. Esto conduce a la interrupción de procesos celulares como la replicación y la transcripción, a la detención del ciclo celular y a la muerte celular generalmente por apoptosis o en ciertos casos, necrosis.^{74, 89, 90} Los procesos de interacción de cisplatino con ADN se han estudiado con gran intensidad durante varias décadas, dada su clara relación con su efecto antitumoral. Desde el punto de vista estructural, se ha caracterizado en diversos modelos a nivel de di- o trinucleótidos, pasando por doble hélices dodecaméricas, y llegando al nivel de nucleosomas.⁵⁴

Tras la hidrólisis del cisplatino, sus acuocomplejos derivados son capaces de reaccionar con el ADN, coordinándose el platino fundamentalmente a través de los N7 de las guaninas (G) y adeninas (A) situadas en el surco mayor de la doble hélice, que son los sitios nucleofílicos más accesibles y reactivos disponibles, como se observa en la Figura 5. No obstante, la unión a G está más favorecida debido a su pKa ligeramente más básico y a los posibles enlaces de hidrógeno entre los H de los NH₃ ligados al Pt y el O6 de la guanina.

Las especies monoacuo- o diacuo- del cisplatino pueden coordinarse al ADN, perdiendo una molécula de agua y dando lugar a un aducto monofuncional. A continuación por pérdida de

un ligando Cl^- (o H_2O), puede coordinarse a un segundo punto en el ADN, dando lugar a un aducto bifuncional. Se han identificado diversos aductos bidentados entrecruzados tanto intracadena como intercadena con cisplatino. En la Figura 6 se resumen los principales aductos formados con el ADN.

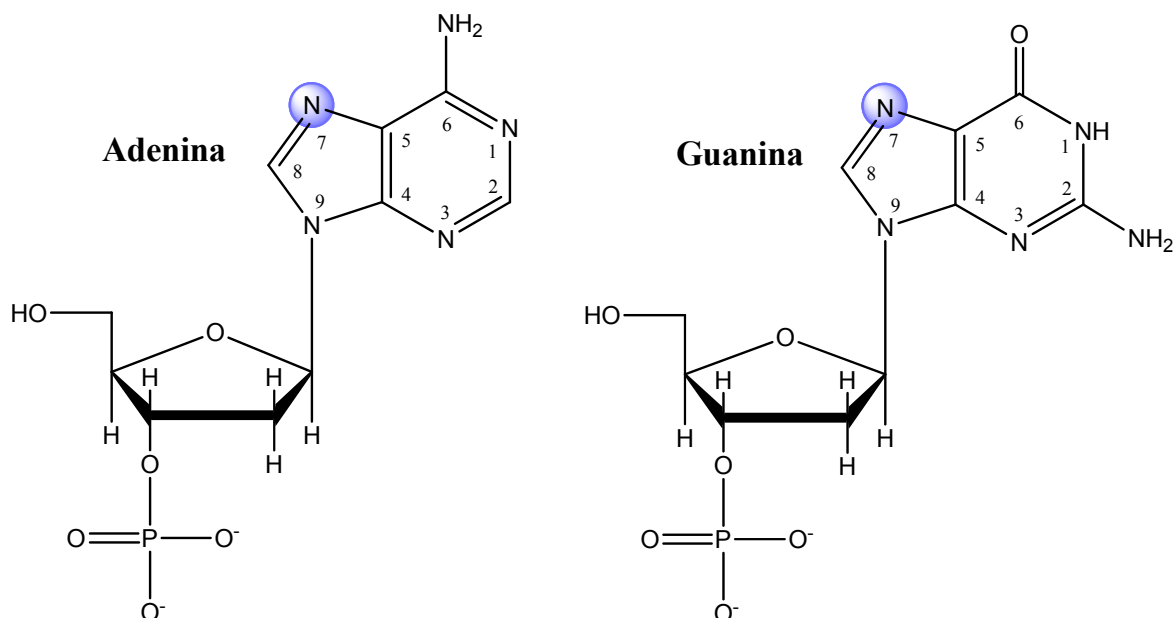


Figura 5. Nucleótidos 5'-fosfato del ADN con las bases nitrogenadas adenina (5'-dAMP) y guanina (5'-dGMP). Se ha resaltado en azul el N7 de ambas, a través del cual se coordinan al Pt.

El aducto mayoritario es el *cis*-1,2, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ -d(GpG) intracadena, que supone alrededor del 65% del total de especies. Otro 25% lo constituyen los aductos *cis*-1,2, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ -d(ApG) intracadena, mientras que los 1,3-d(GpNpG) intracadena suponen entre un 5 y un 10% del total.⁸⁹ También pueden encontrarse en muy baja extensión aductos intercadena principalmente a través de dos guaninas, aductos monodentados y aductos con el platino entrecruzando ADN y una proteína.

Para elucidar la estructura de los aductos formados por cisplatino con el ADN y determinar la distorsión y daños inducidos en la doble hélice, fueron críticos los estudios realizados con difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) en polinucleótidos y ADN superenrollado.

En el caso de los aductos 1,2-d(GpG), el Pt induce una flexión de la doble hélice en 35-40° y un desenrollado de la hélice de alrededor de 25° en el entorno de coordinación.^{91, 92} Como resultado, el surco mayor queda compactado, mientras que el surco menor queda ensanchado y aplanado. El ángulo de enrollado entre guaninas platinadas oscila entre 26 y 49°, lo que resulta en una tensión existente en los enlaces Pt-N7, que desplazan al platino hacia fuera con respecto

al plano de los anillos de las guaninas. Además se ha detectado una distorsión hacia el extremo 5' del aducto, estando las bases platinadas desplazadas hacia el surco mayor, lo cual será un elemento de reconocimiento importante para las proteínas que interaccionen con el ADN platinado.

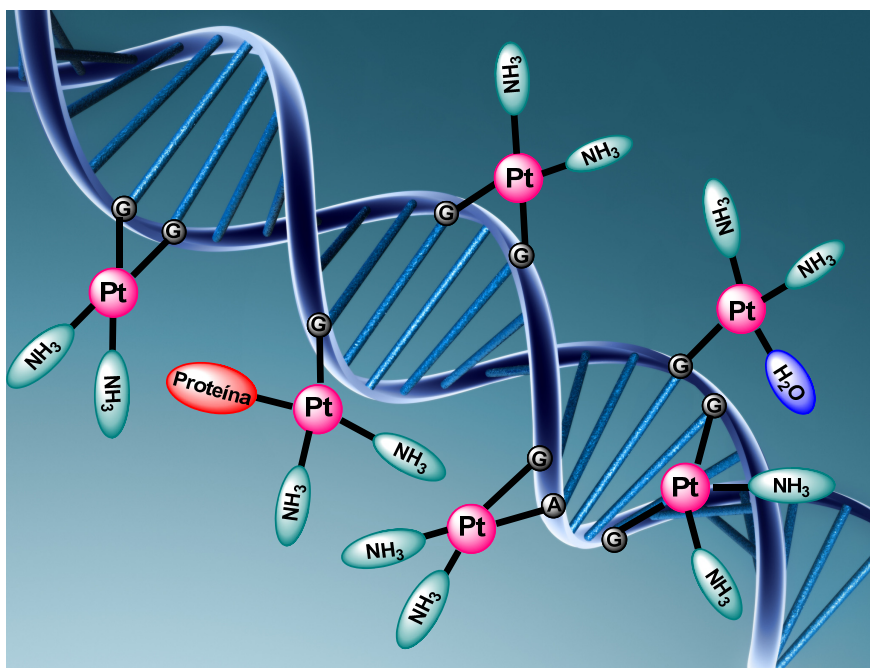


Figura 6. Principales aductos formados tras la unión de cisplatino al ADN.

En el caso de los aductos 1,3-d(GpNpG) intracadena, se induce también una distorsión donde el duplete se dobla 30° y la doble hélice se desenrolla y se ensancha en el surco menor.^{93, 94} En este caso, el emparejamiento de 5'-G platinada con la citosina correspondiente en la cadena opuesta se ve interrumpido y el residuo siguiente a G se ve extruido del surco menor, provocando una gran distorsión local, aunque ésta es globalmente menos pronunciada que en el caso de los aductos 1,2-intracadena.

Por otro lado, en los aductos intercadena,^{95, 96} el $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ se une al surco menor y produce una flexión de la doble hélice de 47° en esa dirección, sufriendo asimismo un desenrollado de 110°, provocando un alejamiento y desemparejamiento de las citosinas opuestas a las guaninas platinadas. La Figura 7 recoge las estructuras distorsionadas de aductos de DNA platinado.

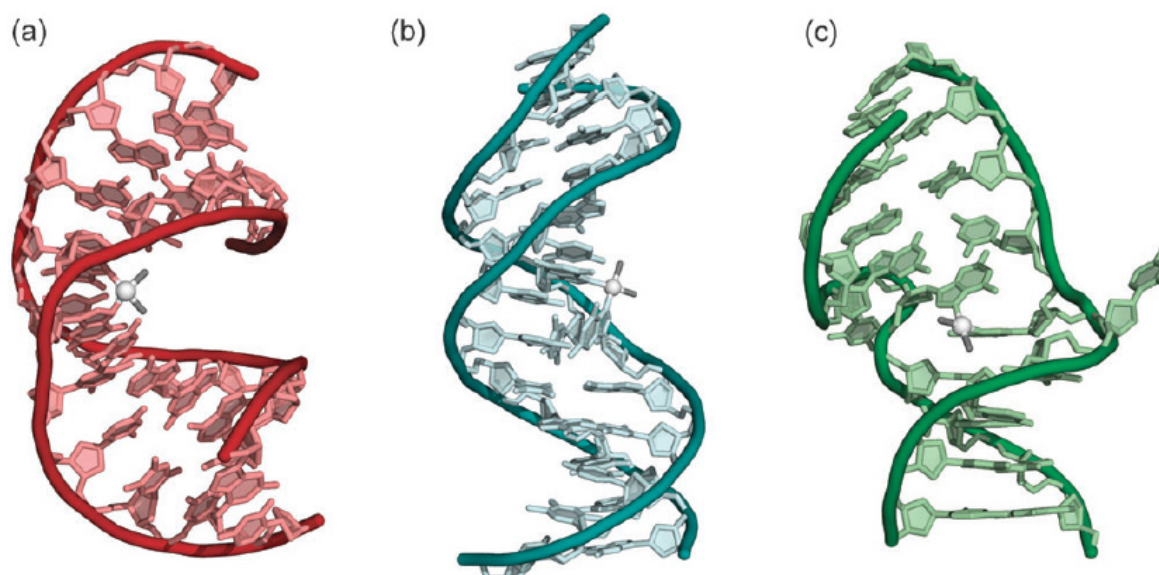


Figura 7. Estructuras distorsionadas de la doble hélice de ADN tras la unión de cisplatino. a) Aducto 1,2-d(GpG) intracadena. b) Aducto 1,3-d(GpTpG) intracadena. c) Aducto intercadena. Extraído de Lippard y col.⁸⁹

Ciertos estudios han demostrado que el cisplatino no sólo modifica la estructura del ADN sino también la de los nucleosomas, que es la superestructura de ADN enrollado alrededor de un núcleo octamérico de proteínas denominadas histonas. En particular, tanto los aductos 1,2-d(GpG) como los 1,3-d(GpTpG), ambos intracadena, son capaces de modificar el posicionamiento rotacional y translacional de los nucleosomas.^{97, 98} Además el cisplatino podrá coordinarse a las histonas constituyentes del octámero.⁹⁹

La incapacidad de formar aductos 1,2-intracadena del isómero transplatino por razones estéricas, el cual forma principalmente aductos 1,3-intracadena e intercadena; unido a su inexistente actividad antitumoral *in vivo*,¹⁰⁰ lleva a pensar que los aductos 1,2-intracadena puedan ser los principales responsables de la actividad antitumoral del cisplatino. Sin embargo, el resto de aductos también pueden contribuir al efecto citotóxico.⁷⁴

1.2.3. Respuesta celular al daño inducido por cisplatino en el ADN

La alteración en el ADN producida por el cisplatino induce un daño asociado a la inhibición de los procesos que implican la separación de las cadenas del ADN como los de replicación y transcripción, bloqueando la actividad de las ADN y ARN polimerasas.⁵⁴ A continuación se produce el reconocimiento celular de dicho daño y se desencadenan una serie de mecanismos que pueden conducir bien a la reparación de ese daño o bien a la muerte celular por

apoptosis o necrosis. Además se produce estrés en el retículo endoplásmico y fenómenos de estrés oxidativo, con producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), que contribuyen a la citotoxicidad. No obstante, el daño directo producido por la interacción de cisplatino con proteínas u otras biomoléculas también puede conducir al desencadenamiento de mecanismos citotóxicos y ha de ser considerado.

1.2.3.1 Reconocimiento proteico de aductos Pt-ADN

En el caso del daño del ADN, son de particular importancia las proteínas capaces de “reconocer” la distorsión inducida, uniéndose a los aductos Pt-ADN con mayor afinidad que al ADN inalterado.¹⁰¹ Éstas incluyen: las asociadas a la reparación de ADN como hMSH2 o hMutS α ; las proteínas del dominio HMG; factores de transcripción como hUBF, la proteína de unión a TATA o YB-1; moduladores de la cromatina como SSRP1; la proteína del gen supresor tumoral p53; o la histona H1, factor nuclear que mantiene la integridad de la unión del nucleosoma al ADN.⁵⁴ En muchos casos, la unión de proteínas al ADN modificado favorece que se desemboque en la muerte celular.

En el caso de las proteínas del dominio HMG (Grupo de alta movilidad), como HMGB1 y HMGB2, éstas reconocen fundamentalmente los aductos $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ -1,2-d(GpG) intracadena y los enmascaran, evitando la reparación de la lesión por el mecanismo NER (reparación por excisión de nucleótidos). El dominio HMG se une al aducto por el surco menor hacia el extremo 3' de la hebra platinada. En esta unión desempeña un papel importante un residuo de fenilalanina (Phe) que se intercala en el bolsillo hidrofóbico creado por el entrecruzamiento del Pt.¹⁰²⁻¹⁰⁶ Estas proteínas también pueden modular procesos en el ciclo celular subsiguientes a su unión y producir la muerte celular.

Por otro lado, la unión del ADN platinado a factores de transcripción puede estar relacionada con su “secuestro” y por tanto, con el hecho de que no alcancen sus verdaderos sitios de unión, inhibiendo el proceso de transcripción a nivel de iniciación e impidiendo la síntesis del ARN. El bloqueo físico al avance de las ARN polimerasas en el sitio donde se encuentra el aducto platinado, impide la elongación por la enzima, existiendo además una falta de movilidad nucleosomal y conduciendo a alteraciones de la organización del nucleosoma en los sitios promotores, que contribuyen a la inhibición de la transcripción.⁸⁹

También es el caso de las proteínas reparadoras, como las AAG, que al unirse a los aductos Pt-ADN pueden verse secuestradas y no son capaces de unirse a sus sustratos naturales, por tanto dejando que las lesiones inicien el proceso de muerte celular inducida.¹⁰⁷

1.2.3.2. Reparación de aductos Pt-ADN

Las lesiones producidas como consecuencia de la formación de aductos entre el cisplatino y el ADN pueden ser reparadas por mecanismos diferentes:

- ***Reparación por excisión de nucleótidos (NER)***

NER es el principal mecanismo para eliminar las lesiones producidas por el cisplatino en el ADN. En primer lugar, las lesiones son reconocidas por complejos proteicos, desenrollando el ADN y efectuando una doble incisión que elimina una sección de oligonucleótidos conteniendo la modificación de platino.⁵⁴ Estudios *in vitro* han demostrado que los aductos 1,3-(GpNpG) intracadena son eliminados con más eficacia mediante NER que los 1,2-intracadena, confirmando la importancia de estos últimos en la acción del fármaco.¹⁰⁸

- ***Reparación de apareamientos erróneos (MMR)***

El sistema de reparación MMR elimina apareamientos erróneos puntuales base-base y mutaciones en la secuencia del ADN.¹⁰⁹ Para ello, ciertas proteínas reconocen y se unen al despareamiento o mutación, se produce la degradación de la hebra conteniendo el error y se rellena el hueco creado. Las proteínas asociadas al MMR pueden participar en el intento de reparación de la hebra opuesta a los aductos con platino en nuevo ADN producido por el mecanismo TLS. Al no conseguir así eliminar el platino causante de la lesión, se establecen fútiles ciclos de intentos de reparación que desembocan en la muerte celular.¹¹⁰ Por tanto, este mecanismo favorece el efecto citotóxico del cisplatino y su inhibición está relacionada con la resistencia al fármaco. Además se ha demostrado que las proteínas hMutSα y hMSH2 reconocen específicamente los aductos 1,2-intracadena con cisplatino.⁵⁴

- ***Reparación por recombinación homóloga***

Este mecanismo es un tipo de recombinación genética por la que las secuencias de nucleótidos son intercambiadas entre dos cadenas similares o idénticas de ADN. El proceso incluye varios pasos de ruptura física y la reunión final del ADN. Se ha demostrado que la recombinación impedida del ADN en modelos celulares aumenta la sensibilidad al cisplatino.¹¹¹
¹¹² Generalmente se asocia a la reparación de aductos Pt-ADN intercadena.

- ***Reparación por síntesis de translesión (TLS)***

Para que el ADN platinado, pueda ser replicado, y por tanto resistir el daño producido, la ADN polimerasa ha de ser capaz de “saltarse” al aducto de platino. Ciertas polimerasas

presentan esa capacidad y dan lugar a la síntesis de translesión.¹¹ De hecho, la sobreexpresión de la β -polimerasa está relacionada con la resistencia a cisplatino, mientras que la ζ -polimerasa¹¹³ tiene un papel importante en la tolerancia a ADN y a la translesión y la ausencia de η -polimerasa está relacionada con el aumento de la sensibilidad al fármaco.¹¹⁴

1.3. Resistencia al tratamiento con cisplatino

La mayor parte de los fracasos en terapias antitumorales se debe a los procesos de resistencia al tratamiento, bien intrínsecos, o bien desarrollados por las células tumorales tras una exposición prolongada al fármaco. Por ejemplo, en el caso de pacientes con cáncer de ovario, existe una respuesta inicial al tratamiento del 70% de los casos, sin embargo menos del 25% de los casos sobreviven pasados cinco años.¹¹⁵ Es también el caso de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, que tras el tratamiento con cisplatino o carboplatino, presentan una tasa de recaída del 95%.¹¹⁶ Por otro lado, en el caso de los cánceres de cabeza y cuello, tan sólo entre el 20 y 30 % de los pacientes responden al tratamiento con fármacos de platino.¹¹⁷ Los procesos de resistencia al cisplatino básicamente pueden deberse a una reducción en la cantidad de fármaco que es capaz de unirse efectivamente al ADN, y a la incapacidad de producirse la muerte celular tras la formación de los aductos con el ADN o tras la activación de otros procesos desencadenantes de la misma.

1.3.1. Resistencia debida a la unión insuficiente al ADN

Un aspecto común a múltiples líneas celulares resistentes tumorales es una reducción en la acumulación de platino en comparación con células sensibles, habiéndose observado una disminución del 20-70%.¹¹ Principalmente esto puede deberse a la entrada reducida o a la salida favorecida del fármaco en la célula y afecta fundamentalmente a los sistemas de transporte mediado, especialmente a los de entrada. En el caso de CTR1, que regula la entrada de cobre y cisplatino a la célula de manera competitiva,¹¹⁸ se ha demostrado que ciertas líneas celulares tumorales resistentes al fármaco expresan CTR1 de forma reducida.¹¹⁹ La expresión de CTR1 se relaciona con una mayor sensibilidad a cisplatino.¹²⁰ Además, se observó que en fibroblastos embrionarios de ratón “*knocked out*” en CTR1, se producía una resistencia incrementada en un factor de 3 comparada con el “*wildtype*”.¹²¹ Por otro lado también se ha visto que un inhibidor de la bomba Na^+/K^+ de la membrana plasmática es capaz de inhibir también la entrada de cisplatino a la célula. Así mismo, se ha observado la implicación en procesos de resistencia de los

transportadores activos involucrados en la salida celular de cisplatino. Así, en el caso de los transportadores de cobre ATP7A y ATP7B, se ha demostrado que la sobreexpresión de estos en diversas líneas celulares produce resistencia a cisplatino.^{42, 120, 122-124} Además, la proteína transportadora MRP2 resultó estar sobreexpresada en líneas celulares de melanoma resistentes a cisplatino.¹²⁵ Por otro lado, se ha comprobado que en ciertos melanomas resistentes al tratamiento con el fármaco, se produce un secuestro del cisplatino, que se incorpora a ciertos orgánulos subcelulares como los melanosomas, los cuales pueden constituir una vía de eliminación al exterior celular del compuesto.¹²⁶

Por otro lado, los tumores pueden reconocer y reorganizar su entorno, adoptando la capacidad de modificar sustancias tóxicas en su exterior antes de que atraviesen la membrana plasmática. En el caso de las células Jurkat resistentes a cisplatino, se observó que eran capaces de transformar los complejos de platino presentes en el medio de cultivo en compuestos de menos de 3 kDa no accesibles al interior celular. Esto ocurría en mayor extensión en comparación con células normales sensibles al fármaco.¹²⁷ Por tanto esto podría constituir un mecanismo de detoxificación extracelular y, por consiguiente, de resistencia.

Otra posible causa de reducción en la cantidad de cisplatino disponible para acceder al ADN es su “secuestro” al reaccionar con otras especies reactivas citoplásmicas, como es el caso de los tioles como GSH o MTs, ricas en grupos cisteínicos.

En el caso de GSH, un tripéptido con un residuo Cys, actúa como un importante antioxidante celular, manteniendo el entorno reductor mediante la conversión de su forma reducida (GSH), con un sulfhidrilo, a su forma oxidada (GSSG), con un puente disulfuro. GSH puede actuar como detoxificador de la célula al formar aductos con cisplatino, mediado por la acción de glutatión-S-transferasas (GSTs), que producen un compuesto platinado por coordinación a los grupos tiol,¹²⁸ que puede ser eliminado mediante las bombas MRP1 y MRP2 dependientes de ATP.⁹⁰ De hecho, en tumores resistentes a cisplatino, se detectó una sobreexpresión de GSTs.¹²⁹ Sin embargo, el papel de GSH en la resistencia a cisplatino está aún en debate y por comprobar. Inicialmente se observó que la reducción de los niveles de GSH en líneas celulares tumorales puede producir un aumento en la sensibilidad a cisplatino.¹³⁰ Por otro lado, se postuló una correlación entre la inactividad de cisplatino en líneas celulares de cáncer de ovario y los niveles elevados de GSH.¹³¹ Sin embargo, otros estudios ponen en duda este claro papel de GSH, ya que tras examinar 19 diferentes líneas celulares, no se encontró una clara correlación entre la potencia de acción de cisplatino y los niveles de GSH en las células estudiadas.¹³² Por otra parte, recientemente se observó que los niveles elevados de GSH podrían incluso sensibilizar a las células hacia el fármaco, al inducir la sobreexpresión del transportador

hCTR1.¹³³ En cualquier caso, contrariamente a lo que se pensaba hace años, aunque el GSH es un claro bioligando para cisplatino, tampoco parece ser el principal objetivo a nivel celular.^{56, 68}

Por otro lado, las MTs son proteínas de bajo peso molecular muy ricas en cisteínas, que desempeñan un papel protector de las células hacia la toxicidad y estrés oxidativo producidos por metales pesados (Cd, Zn, Cu, Hg, Ag, Au, Bi, As, Co, Fe, Pb, Tc), además de constituir un sistema de regulación de los niveles de Zn y Cu en las células.¹³⁴ A través de sus residuos cisteínicos pueden coordinarse generalmente hasta a 7 metales formando clústers metal-tiolato, en el caso del Zn.¹³⁵ La capacidad de coordinación de cisplatino a las MTs a través de sus cisteínas también ha sido comprobada, provocando en dicho proceso el desplazamiento de átomos de Zn.^{67, 128} En este caso, se ha relacionado la sobreexpresión de metalotioneínas con una notable inducción de resistencia a cisplatino en líneas celulares.¹³⁶⁻¹³⁸

Finalmente, otra proteína que también participa en la regulación del estado redox celular es la tioredoxina, que además está involucrada en la regulación de factores de transcripción, de la apoptosis o de la síntesis de ADN. En este caso, se ha encontrado una correlación entre los niveles de tioredoxina y la resistencia a cisplatino en diversos tipos de células tumorales.⁶⁹

1.3.2. Resistencia tras la unión al ADN

En el caso de que el cisplatino llegue a reaccionar y a formar aductos con el ADN, puede tener lugar la supervivencia celular, y por tanto la resistencia al tratamiento, bien a través de la reparación o eliminación de los aductos formados, o mediante mecanismos de tolerancia.

En cuanto a los mecanismos de reparación del ADN expuestos en la sección 1.2.3.2., el mecanismo NER es el más efectivo para eliminar lesiones en el ADN causadas por el cisplatino. En células de cáncer de ovario resistentes a cisplatino se detectó la expresión elevada de proteínas involucradas en el NER,¹³⁹ mientras que la supresión de éstas a través de la manipulación del ARN causaba un aumento en la sensibilidad al fármaco.¹⁴⁰

Por otro lado, la pérdida de la función de la vía reparadora MMR en las células es otra causa de una mayor tolerancia al daño producido por cisplatino al impedir la vía apoptótica involucrada.^{141, 142} Otro mecanismo implicado en la tolerancia al fármaco es la reparación por síntesis de translesión, que si se ve favorecida, contribuye a la resistencia al tratamiento.

Finalmente, puede producirse tolerancia a los fármacos antitumorales a través de una expresión reducida o pérdida total de las vías de señalización apoptótica, como las que están mediadas por p53, las proteínas de la familia Bcl-2 o JNK.¹⁴³

1.4. Efectos secundarios. Nefrotoxicidad. Agentes nefroprotectores

Como se ha expuesto, la formación de aductos con el ADN conduce a lesiones citotóxicas en células tumorales, pero también puede ocurrir en otras células en división. Generalmente este tipo de fármacos presentan menor grado de toxicidad en células no proliferativas.¹⁴⁴ Además, dado que las células tumorales se caracterizan por un crecimiento y división celular extraordinariamente rápidos en comparación con los de las células sanas, y que los mecanismos de reparación de estas últimas son más efectivos, puede explicarse que la acción citotóxica del fármaco esté centrada fundamentalmente sobre células tumorales. Sin embargo, otras células sanas sensibles pueden también resultar afectadas. Como consecuencia se producen los anteriormente mencionados efectos tóxicos asociados al tratamiento con cisplatino (nefrotoxicidad, ototoxicidad y neurotoxicidad).¹¹

La respuesta al tratamiento con cisplatino depende de la dosis administrada. Generalmente la dosis aplicada a tratamientos paliativos es de 10-20 mg m⁻², de 50 mg m⁻² para tumores ováricos metastásicos o de 100 mg m⁻² para los cánceres de cabeza y cuello. No obstante, la respuesta en el último caso es de tan sólo un 19 %, aunque existen estudios que demuestran que la tasa de éxito podría incrementarse hasta un 83 % para dosis de 200 mg m⁻². Sin embargo, en dichas condiciones se observa fallo renal grave hasta en el 20 % de los pacientes, lo cual refleja el hecho de que la nefrotoxicidad inducida por cisplatino sea el efecto secundario que más limita la dosis de cisplatino administrable, y por tanto la eficacia del tratamiento. Esto pone de manifiesto la magnitud del problema asociado a los efectos tóxicos del cisplatino.

1.4.1. Nefrotoxicidad

En el caso de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, ésta se manifiesta en un tercio de los pacientes tratados con un cuadro clínico que consiste en la pérdida de peso y en síntomas propios del daño renal como: una tasa de filtración glomerular (GFR) reducida; un aumento significativo en la concentración de nitrógeno ureico (BUN) y de creatinina en sangre (azotemia); niveles reducidos de magnesio y potasio en sangre; poliuria (producción de un volumen de orina elevado debido a una disminución en los canales de acuoporinas¹⁴⁵); proteinuria y glucosuria (niveles excesivos de proteína y glucosa, respectivamente, en orina) y pérdida de potasio, sodio, magnesio y calcio a través de la orina, debido a una deficiente reabsorción tubular.^{144, 146} Los síntomas pueden aparecer al poco tiempo del tratamiento: a las

24-48 h tras la administración se observa poliuria, a las 48-72 h se ve impedida la reabsorción tubular y a partir de las 72-96 h se observa una clara disminución de la GFR. Muchos de estos efectos pueden ser reversibles con el tiempo y tras el cese del tratamiento, pero en algunos casos, pueden ser irreversibles, sobre todo a altas dosis y tratamientos prolongados.¹⁴⁴

Cabe destacar que generalmente el daño renal se localiza en la corteza, pero no en la médula renal. Así la nefrotoxicidad inducida se debe principalmente al daño producido sobre las células del túbulo proximal renal, situadas en la corteza renal, donde la exposición a cisplatino es considerablemente superior a la de otros tipos celulares, siendo la concentración del fármaco 5 veces superior en estas células a la encontrada en suero sanguíneo.¹⁴⁷ Este hecho es debido a que el proceso de excreción de cisplatino tiene lugar a través de filtración glomerular en las nefronas renales, y en cierta extensión por secreción tubular, como se explicará a continuación.¹⁴⁴ En la Figura 8 se ilustran las distintas zonas morfológicas del riñón.

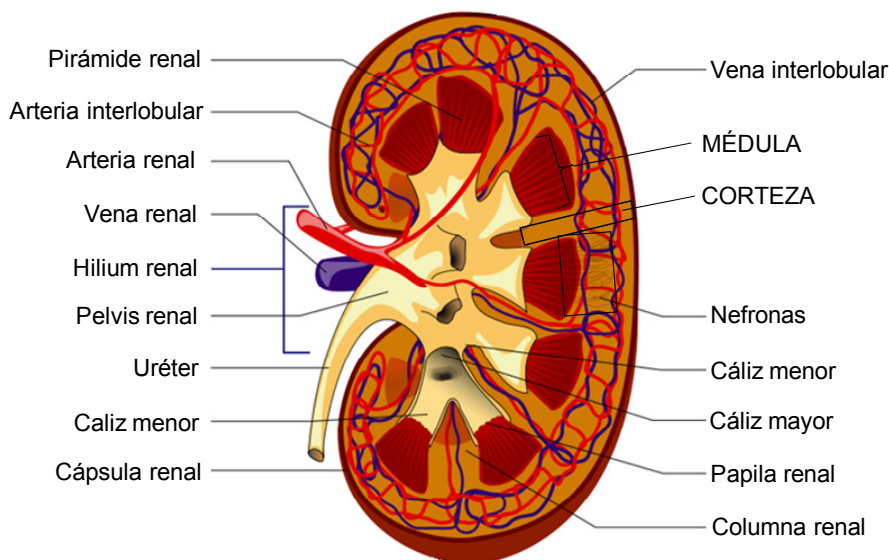


Figura 8. Estructura y morfología del riñón. La figura muestra una representación de un corte sagital.

El riñón está provisto de 1-2 millones de nefronas, que constituyen la unidad funcional del sistema renal de depuración de la sangre. En la Figura 9 se muestra la organización estructural de una nefrona. En primer lugar, los corpúsculos renales de la nefrona (formados por glomérulos y cápsula de Bowman) funcionan a modo de filtros para la sangre con un corte molecular de unos 50-70 kDa, permitiendo el paso de moléculas pequeñas. A continuación el filtrado glomerular generado pasa a un sistema de túbulos donde, por un lado, se reabsorberán y recuperarán hacia un sistema de capilares sanguíneos aquellas moléculas que sean esenciales y que escapen al corte del filtro glomerular, tales como aminoácidos, glucosa, fosfatos, proteínas,

etc; y por otro lado se producirá una reducción en el volumen total de fluido filtrado que finalmente terminará excretándose como orina. Este sistema de túbulos está compuesto por el túbulo proximal, seguido del asa de henle, túbulo distal y finalizando en el túbulo colector, donde se recoge la orina hacia el uréter. Existen indicios de la acumulación de cisplatino en la nefrona proximal y distal, siendo el segmento del túbulo proximal S3 el que podría acumular la mayor cantidad de fármaco, seguido del túbulo colector distal y de los segmentos S1 del túbulo proximal, a tenor de ensayos en sus correspondientes tipos celulares.¹⁴⁴ Como consecuencia, el túbulo proximal es el que experimenta un mayor grado de daño.¹⁴⁸

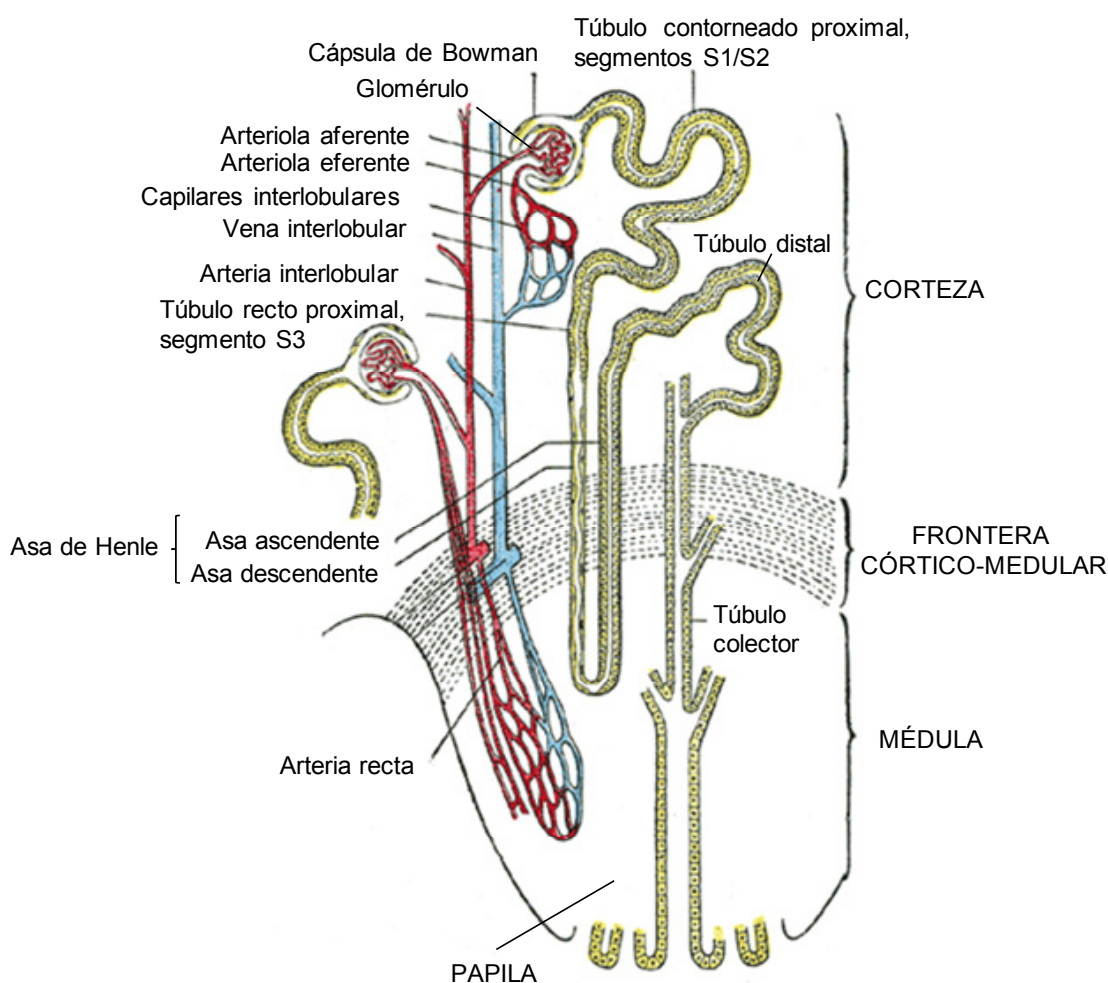


Figura 9. Representación de las partes constituyentes de una nefrona renal y su localización en el riñón.

Para entender la acumulación de cisplatino en el túbulo proximal renal hay que considerar que su monocapa de células epiteliales (*“Renal Proximal Tubule Epithelial Cells”,* RPTECs) sufre una exposición continua al fármaco debido al sistema de transportadores de que consta, que son capaces de introducir con gran eficiencia el cisplatino en su interior. Es interesante destacar

que la contribución a la acumulación de platino a través de la membrana basolateral de las RPTECs es superior a la apical de borde en cepillo, como puede observarse en la Figura 10, de manera que el compuesto puede acceder a estas células por las vías de filtración glomerular o por secreción tubular.

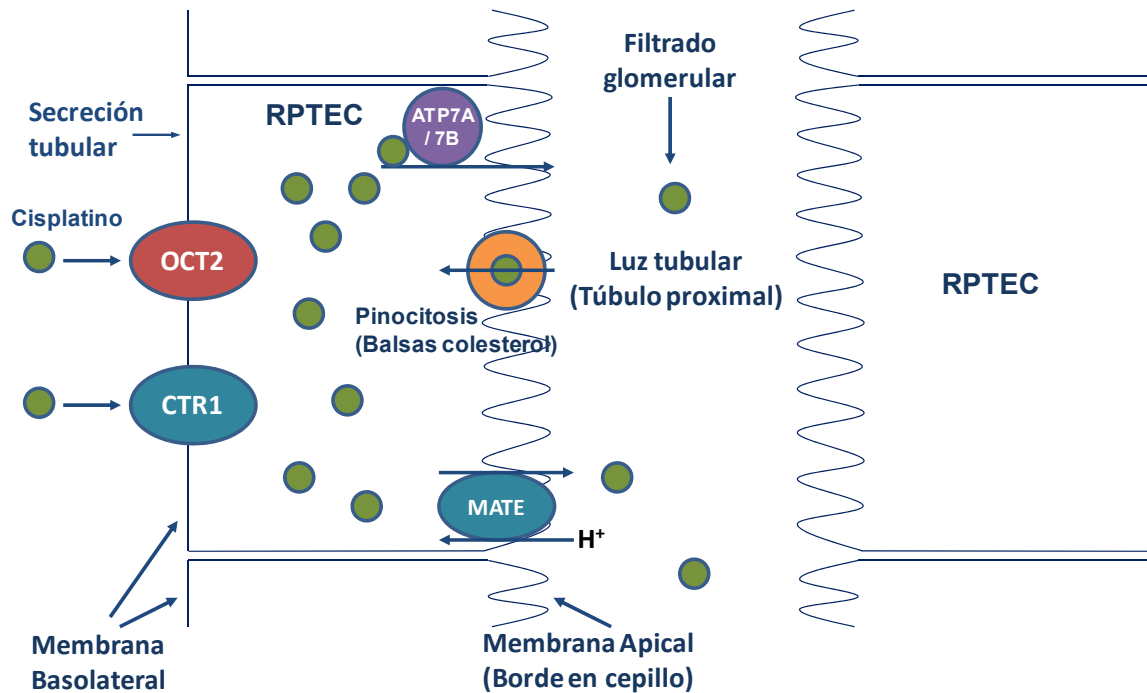


Figura 10. Proceso de acumulación de cisplatino en el interior de las células epiteliales del túbulo proximal, como causa de la nefrotoxicidad inducida.

En particular, el transportador OCT2, que es la isoforma de OCT específica en riñón humano, situado en la membrana basolateral de las células, ha sido propuesto como el mayor contribuyente a la entrada de cisplatino en éstas y además está altamente expresado en los tres segmentos del túbulo proximal.^{35, 149-151} Es interesante destacar que otros compuestos de platino no nefrotóxicos, como nedaplatino o carboplatino no pueden ser transportados por OCT2. Sin embargo, oxaliplatino tampoco es nefrotóxico y sí es transportado por OCT2, aunque en este caso, su acumulación es inferior porque el transportador MATE situado en su membrana apical lo expulsa con gran efectividad hacia la luz tubular y como consecuencia se produce una acumulación celular inferior del compuesto.¹⁴⁸ Por otro lado, el transportador CTR1 también desempeña un papel importante en la introducción en este tipo de células, ya que está especialmente expresado en los túbulos distal y proximal, principalmente a nivel basolateral.¹⁵² Además, en la membrana apical de borde en cepillo existe otro sistema de transporte basado en macropinocitosis mediada por balsas de colesterol que probablemente permiten la introducción

de cisplatino por vía apical.¹⁵³ Sin embargo, la acumulación del elemento no siempre es proporcional al daño causado, sino que también depende de las especies que se forman en el tejido en cuestión, y por tanto de la forma en que se encuentre.

Una vez dentro de las células renales, el cisplatino podría sufrir una activación metabólica, donde podrían estar implicadas la γ -glutamyl transpeptidasa o la cisteína-S-conjugada β -liasa, transformándolo en una especie tóxica.¹⁵⁴ Sin embargo, los mecanismos de nefrotoxicidad son muy complejos y no están completamente elucidados, ya que además del daño en el ADN, la formación de complejos Pt-proteínas puede tener un papel relevante en el daño renal. Como consecuencia de la acumulación de cisplatino en las células, se desencadenan procesos de muerte celular bien por apoptosis (por vía extrínseca mediada por receptores de muerte; vía intrínseca o mitocondrial, la principal ruta apoptótica en este caso; o por vía de estrés del retículo endoplasmático); o bien por necrosis, dependiendo de la dosis de cisplatino. Generalmente se observa muerte de las células renales por necrosis para altas dosis (milimolar) y por apoptosis para bajas dosis (micromolar) de cisplatino, aunque no son excluyentes.¹⁵⁵ Además, se inducen factores reguladores del ciclo celular como el p21, se produce la activación de p53, que señala los procesos apoptóticos, se activan las MAPKs, se produce estrés oxidativo, induciendo la formación de ROS, como $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ o H_2O_2 , que actúan sobre proteínas, lípidos o ADN, destruyendo su estructura; y posiblemente RNS, como peroxinitrito u óxido nitroso.¹⁴⁴ También se genera una respuesta inflamatoria, mediando todos estos efectos citados anteriormente en el daño renal observado.¹⁴⁶

1.4.2 Estrategias nefroprotectoras

Dada la gravedad de los efectos inducidos sobre el riñón tras el tratamiento con cisplatino, desde su introducción en terapias antitumorales se han propuesto múltiples estrategias para paliar dichos efectos, que están enfocadas a combatir los distintos procesos involucrados en el daño renal. En primer lugar, la hidratación intensiva del paciente junto con la administración de manitol, antes, durante y después de las infusiones, consigue reducir en cierta medida los efectos nefrotóxicos y se adopta generalmente de forma estándar¹⁵⁶, aunque el empleo de suero salino sólo o con furesimida mejora los resultados. Posiblemente estas estrategias favorecen la excreción de cisplatino y reducen la formación de compuestos tóxicos. También se ha visto que la inhibición de γ -glutamyl transpeptidasa, de cisteína-S-conjugado β -liasa,¹⁵⁷ o de glutatión-S-transferasa,¹⁵⁸ bloquean una vía metabólica de cisplatino, reducen su nefrotoxicidad y potencian

sus efectos antitumorales. Otra estrategia es el bloqueo de vías de entrada celular del fármaco. Este es el caso de compuestos que impiden o reducen la entrada a través de OCT2 (como la cimetidina,¹⁵⁹ que compite por este transportador) o el glicación,¹⁶⁰ que reduce la expresión de OCT humano. En este sentido, el empleo de aminoácidos sulfurados también consigue bloquear parcialmente la entrada de cisplatino al formar complejos con platino y actuando, por tanto, de “agentes de rescate”.¹⁶¹ También se han aplicado bloqueantes de las vías de muerte celular (Fas/TNRF,¹⁶² Bax/Bak,¹⁶³ caspasas¹⁶⁴), que reducen los efectos tóxicos en riñón. Por otro lado, se han propuesto estrategias centradas en reguladores del ciclo celular (como inhibidores de cdk2, como p21 o purvalanol¹⁶⁵). Asimismo presentan efectos nefroprotectores los inhibidores de p53¹⁶⁶ o los de MAPKs.¹⁶⁷ Por otro lado, para combatir el estrés oxidativo asociado al daño renal, se ha propuesto el uso de numerosos antioxidantes como N-acetilcisteína,¹⁶⁸ licopeno,¹⁶⁹ vitaminas C^{170, 171} y E,¹⁷² selenio inorgánico,¹⁷²⁻¹⁷⁵ selenometionina,¹⁷⁶ selenocisteína,¹⁷⁷ melatonina,¹⁷⁸ ácido elágico,^{179, 180} glutamina,¹⁸¹ degradantes de peróxido de hidrógeno como la catalasa,¹⁸² o el agente amifostina,¹⁸³ que desempeña varias funciones: unión a radicales libres y reducción de la formación de aductos platinados con el ADN. Además se han diseñado otros agentes para combatir los procesos inflamatorios, como los salicilatos¹⁸⁴ o interleukina-10,¹⁸⁵ que inhiben la formación del factor inflamatorio TNF- α . Por último se han propuesto otros agentes, como los fibratos,¹⁸⁶ que inhiben la acumulación de ácidos grasos y suprimen la apoptosis.

Sin embargo, en muchos casos, los agentes propuestos se han evaluado sólo a nivel de ensayos *in vitro* en cultivos celulares e *in vivo* en animales, de forma que habría que comprobar sus efectos en humanos. Además, dado que los efectos de cisplatino están basados en múltiples dianas celulares, una estrategia nefroprotectora enfocada a bloquear una sola ruta, presentará efectos protectores parciales e incompletos. De esta forma, lo ideal sería utilizar una combinación de agentes protectores centrados en mecanismos diferentes para mejorar los resultados. No obstante, es necesario evaluar si muchos de esos agentes nefroprotectores, que generalmente han sido ensayados en células renales y animales sanos, pudieran presentar alguna influencia sobre los efectos citotóxicos de cisplatino en células tumorales y, por tanto, limitar su eficacia. Parece claro que hace falta encontrar estrategias que inhiban selectivamente los efectos nefrotóxicos del fármaco sin mermar su capacidad antitumoral, y para ello es vital dilucidar las diferencias fundamentales en la respuesta a cisplatino de las células renales y las tumorales.

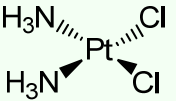
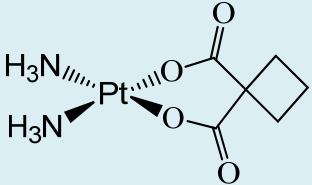
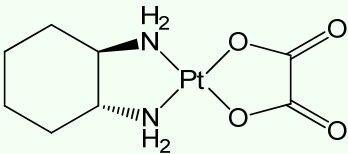
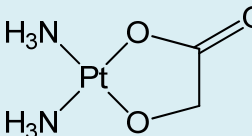
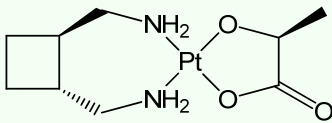
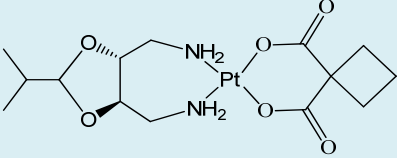
1.5. Terapias mejoradas basadas en fármacos de platino

Dados los problemas asociados a las terapias con cisplatino, respecto a efectos tóxicos y resistencia al tratamiento, durante las últimas décadas se comenzó la búsqueda de otros compuestos de platino alternativos con propiedades mejoradas. Generalmente se busca reducir o eliminar dichos efectos secundarios y mejorar la llegada selectiva del fármaco a las células tumorales, ampliar el espectro de actividad antitumoral existente y superar los efectos de resistencia a cisplatino, e incluso facilitar el modo de administración del fármaco que requiere infusiones continuadas y administración periódica hospitalaria.

Para ello, durante mucho tiempo se trabajó en la síntesis de nuevos complejos de platino siguiendo las reglas de Cleare y Hoeschele establecidas en 1973,¹⁸⁷ también llamadas de “estructura-actividad”, por las que se creía que los complejos de platino presentarían actividad antitumoral. Éstas se resumen de la siguiente forma: i) El complejo puede ser de Pt (II) o de Pt (IV), siendo en general los de Pt (IV) menos activos que los de Pt (II), pero más solubles en agua y siendo estos probablemente activados tras su reducción a Pt (II) a nivel celular. ii) Los complejos deben contener dos ligandos “fijos” aminados en posiciones *cis*. Estos han de ser amoniacos o aminas primarias o secundarias, ya que la presencia de aminas terciarias los inactiva. iii) Ha de presentar también ligandos “salientes” aniónicos unidos por enlaces de fuerza media ya que los que sean muy lábiles originan compuestos muy tóxicos y los que se unen fuertemente producen complejos inactivos. iv) El complejo ha de ser neutro para facilitar la entrada en la célula a través de la membrana plasmática.

Aunque la aplicación de estas reglas permitió desarrollar los derivados llamados de segunda y tercera generación, es cierto que también supuso una limitación al avance en el hallazgo de nuevos fármacos porque, como se vio posteriormente, su incumplimiento no siempre supone que la actividad antitumoral desaparezca. Como resultado, en los últimos cuarenta años se han propuesto y han entrado en estudios clínicos una veintena de compuestos de platino, si bien con éxito relativo. En la Tabla 1 se incluyen los fármacos de platino que están actualmente autorizados para uso humano, entre los cuales tan sólo tres se encuentran aprobados a nivel mundial (cisplatino, carboplatino y oxaliplatino) y otros tres únicamente en determinados países (nedaplatino, lobaplatino, y heptaplatino).

Tabla 1. Fármacos de platino de aprobados para uso humano

Fármaco	Estructura	Lugar de aprobación	Efecto tóxico más limitante	Comercialización
Cisplatino		Mundial	Nefrotoxicidad	Genérico
Carboplatino		Mundial	Mielosupresión	Genérico
Oxaliplatino		Mundial	Neurotoxicidad	Sanofi-Aventis
Nedaplatino		Japón	Mielosupresión	Shionogi Pharmaceuticals
Lobaplatino		China	Trombocitopenia	Asta-Medica
Heptaplatino		República de Corea	Nefrotoxicidad/ sangrado intra-abdominal	SK Chemicals Life Sciences

El primer ejemplo basado en la variación de ligandos respecto a los de cisplatino, es el fármaco de segunda generación **carboplatino** (*cis*-diamino-[1,1-ciclobutanodicarboxilato] platino (II)), que supuso el cambio de los aniones Cl^- por un ligando saliente más estable, bajo la hipótesis de que eso crearía un complejo menos tóxico. Efectivamente, el carboplatino es menos nefrotóxico (no emplea los transportadores OCT para entrar en la célula), es menos tóxico para el tracto gastrointestinal y menos neurotóxico y ototóxico. Sin embargo, la mielosupresión que produce, fundamentalmente la trombocitopenia, es un factor limitante de la dosis. Su administración también tiene lugar por vía intravenosa. Los aductos que forma con el ADN son fundamentalmente los mismos que con cisplatino,⁸⁹ sin embargo, se requieren concentraciones 20-40 veces superiores de carboplatino y la tasa de formación de aductos es 10 veces más lenta.¹⁸⁸ No obstante, dada su inferior reactividad, puede ser administrado en dosis entre 300 y

450 mg m⁻². Su aprobación por la FDA se completó en 1989 para el tratamiento de cáncer de ovario, con una actividad similar a la del cisplatino, siendo generalmente el fármaco de elección para su tratamiento. Actualmente se emplea en todo el mundo también para el tratamiento de cánceres de cabeza y cuello, ovarios, mama, pulmón, testículos, vejiga y cerebro.¹⁸⁹

En una segunda aproximación se ensayó el cambio de los ligandos de cisplatino por otras aminas, dando lugar al fármaco de tercera generación **oxaliplatino** (1*R*,2*R*-diaminociclohexano oxalato platino (II)). Este compuesto es más soluble en agua que los anteriores complejos platinados y, contrariamente a aquellos, su acumulación es menos dependiente de CTR1 y existen diferencias en los aductos formados con el ADN,⁸⁹ no siendo capaces las proteínas asociadas al MMR de reconocerlos. Oxaliplatino presenta actividad contra determinados cánceres con resistencia adquirida a cisplatino.¹⁹⁰ De hecho, en combinación con 5-fluorouracilo o leucovorina, es especialmente efectivo para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico (58 % de respuesta).¹⁹¹ Esto supuso un avance relevante ya que hasta entonces el cáncer de colon resultaba resistente a los fármacos de platino. Por otro lado, el oxaliplatino es menos nefrotóxico y ototóxico que cisplatino y menos mielosupresivo que carboplatino. Sin embargo, el compuesto induce neuropatías que, en terapias prolongadas, pueden ser no reversibles.¹⁹² Fue aprobado en 1999 por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y en 2002 por la FDA.¹⁹³

En el caso del **nedaplatino** (*cis*-diaminoglicolatoplatino(II)), éste se emplea desde su aprobación en 1995 en Japón para el tratamiento de cánceres de cervicales y de ovario, de cabeza y cuello, esofágicos y de vejiga.⁵ Puede considerarse similar a carboplatino, ya que es un complejo de Pt(II) que mantiene los dos ligandos NH₃, con un ligando saliente bidentado que forma un anillo quelato de cinco miembros. Además, como el anterior, es mielosupresivo (limitando la dosis administrable, hasta 90 mg m⁻²)¹⁹⁴ y tampoco utiliza los OCTs para entrar en la célula. Por otro lado, es menos nefrotóxico que carboplatino y cisplatino y presenta una actividad superior al carboplatino y equivalente a la de cisplatino.

El **lobaplatino** (*R,R/S,S*)-(1,2-ciclobutanodimetanamida)[(2*S*)-2-hidroxiopropanoato, O,O']platino(II), está aprobado para su uso en China. Éste produce cierta toxicidad gastrointestinal y trombocitopenia, que es un factor limitante de la dosis administrable.¹⁹⁵ Además, presenta menor nefro-, oto-, o neurotoxicidad comparado con el cisplatino. El lobaplatino se emplea para el tratamiento de cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de mama y ciertas formas de leucemia, y se administra por vía intravenosa.¹⁹⁶

Por último, el **heptaplatino**, *cis*-malonato[4*R*,5*R*]-4,5-bis(aminometil)-2-isopropil-1,3-dioxolano]platino(II), está aprobado para su uso como fármaco en la República de Corea.

Presenta efectividad contra líneas celulares con resistencia a cisplatino relacionada con altos niveles de metalotioneínas (probablemente debido a su menor reactividad en sus reacciones de sustitución, similar a la de carboplatino, de manera que no sería fácilmente inactivado). Se emplea para tratar el cáncer gástrico y en combinación con paclitaxel, cánceres microcíticos de cabeza y cuello.¹⁹⁷ Sin embargo, presenta como efectos secundarios hepatotoxicidad, mielosupresión y nefrotoxicidad, lo que es limita la dosis, a un máximo de 480 mg m^{-2} .⁵

Existen además una serie de compuestos de platino que se encuentran actualmente en fase de evaluación con ensayos clínicos (satraplatino, picoplatino, lipoplatino y prolindac), cuyas estructuras se muestran en la Figura 11. En el caso de **satraplatino** (bis-acetato-amino-dicloro-ciclohexilaminoplatino(IV)), se trata de un complejo de Pt (IV) que constituye el primer candidato administrable por vía oral, lo cual supondría una mejora en la calidad de los tratamientos. En estudios preclínicos se vio que presentaba una actividad comparable a la de cisplatino o carboplatino e incluso mostraba actividad antitumoral en líneas celulares con resistencia adquirida a cisplatino (debida a un transporte reducido) como de cáncer de pulmón, ovárico, cervical y de próstata.¹⁹⁸ El satraplatino se absorbe en la mucosa gastrointestinal y en el torrente sanguíneo se reduce dando lugar a seis compuestos de Pt(II), entre los que el mayoritario es *cis*-aminodicloro-ciclohexilamino-platino(II),¹⁹⁹ el cual retiene su actividad en células que hayan perdido el transportador CTR1. Además se une al ADN de forma semejante al cisplatino y los aductos formados se reparan por la vía NER con una cinética similar. Actualmente se encuentra en ensayos de fase I, II y III, en combinación con otros fármacos, para el tratamiento de diversos tumores.⁵ Presenta menos efectos secundarios que cisplatino, aunque produce náuseas, vómitos y mielosupresión.

El **picoplatino** (*cis*-aminodicloro-2-metilpiridina platino (II)) se diseñó con el fin de introducir un residuo voluminoso alrededor del centro platinado, como puede apreciarse en la Figura 11. Esto conduce a un impedimento estérico al ataque por nucleófilos, particularmente por tioles intracelulares. Mantiene actividad frente a líneas celulares resistentes a cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.⁹⁰ Además tanto por vía oral como intravenosa muestra actividad *in vivo* y en diferentes ensayos se ha comprobado su actividad en el tratamiento de cáncer de ovarios. Actualmente se está evaluando en fase I y II en combinación con 5-fluorouracilo y leucovorina para el tratamiento de cáncer de colon, en combinación con docetaxel para el cáncer de próstata, y para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico. Para este compuesto se han observado como efectos secundarios neutropenia, trombocitopenia, náuseas y vómitos, mientras que no se induce neuro- o nefrotoxicidad.⁵

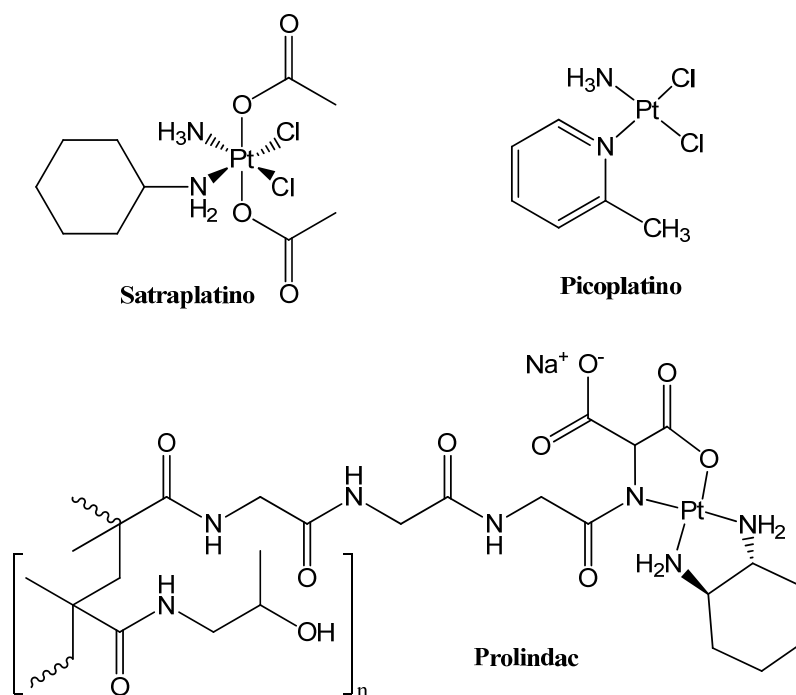


Figura 11. Estructuras de complejos de platino actualmente en fase de ensayos clínicos.

El **prolindac**[®] es un nanopolímero (Figura 11) que consiste en el resto activo de oxaliplatino [Pt(R,R-dach)] unido a un polímero hidrofílico biocompatible, de manera que alcanza mejor los tumores sólidos gracias a la mayor permeabilidad y el efecto de retención de las macromoléculas en tumores.⁹⁰ El quelato amidomalonato-Pt, unido al centro metálico a través de átomos de N y O, es estable a pH fisiológico, mientras que a pH ácido se favorece la ruptura de estos enlaces y la liberación de un complejo de platino activo. Dado que el pH extracelular de los tumores sólidos resulta ser en muchas ocasiones más ácido que el de los tejidos sanos, esto contribuye a la llegada selectiva del agente antitumoral a los tumores. A dosis equitóxicas con respecto a oxaliplatino, el prolindac hace llegar 16 ó 14 veces más platino a la célula tumoral o al ADN.²⁰⁰ El compuesto se encuentra en fase II para el tratamiento de cáncer de ovario.⁵

El **lipoplatino**[®] es una forma encapsulada liposomal de cisplatino, desarrollada con el objetivo de reducir la toxicidad del fármaco y permitir la administración de dosis superiores, a la vez que mejorar la llegada selectiva a tumores primarios y metastásicos.²⁰¹ El lipoplatino atraviesa la membrana plasmática más fácilmente que el cisplatino gracias a la naturaleza de micela inversa de los liposomas nanoparticulados. Además, estos están recubiertos de polietilenglicol, lo que evita que sean reconocidos por anticuerpos. Al presentar un reducido tamaño de partícula y al circular fácilmente por el torrente sanguíneo, los liposomas llegan fácilmente a los tumores, que están altamente vascularizados. Se han efectuado ensayos en fase I,

II y III en cáncer pancreático, gástrico, de cabeza y cuello.⁵ En 2007 fue declarado fármaco huérfano en combinación con gentamicina para el tratamiento de cáncer de páncreas por la EMA. En general mediante el uso de lipoplatino se observa que todos los efectos tóxicos se ven reducidos respecto a cisplatino.

Sin embargo, como se comprueba, en muy pocos casos los complejos de platino que han entrado en ensayos clínicos han terminado comercializándose y empleándose en terapias clínicas, habiendo sido abandonados en la mayoría de los casos bien debido a una falta de actividad, bien por sus efectos tóxicos asociados o incluso por motivos económicos.⁹⁰ Éste ha sido el caso de una decena de compuestos que inicialmente resultaban prometedores pero que finalmente corrieron como misma suerte su abandono (JM-11, NSC170898, ormaplatino (o tetraplatino), enloplatino, sebriplatino, zeniplatino, espiroplatino, cicloplatam, iproplatino, miboplatino, TRK-710, SPI-077, aroplatino, BBR3464).⁵ Es de destacar que éste último se trata de un compuesto triplatinado catiónico, que no sigue las reglas “estructura-actividad”, al igual que en el caso del ormaplatino, que es un complejo de platino (IV) que presenta dos ligandos amino en posición *trans* y un ligando ciclohexano.²⁰²

En muchos casos, para mejorar las terapias se plantea: la administración conjunta del complejo de platino con otro compuesto antitumoral para conseguir una acción sinérgica; con otro tipo de agente que module alguna de las causas de resistencia al fármaco o con agentes protectores de los efectos tóxicos.^{74, 90} En cualquier caso, a falta de compuestos alternativos que puedan sustituir a cisplatino, queda demostrado que el empleo de este fármaco sigue siendo ineludible y esencial en terapias antitumorales, siendo aún aplicado en el 50% de los tratamientos. Por tanto, es necesario contribuir a la elucidación de sus mecanismos de acción y toxicidad con el fin de comprender los procesos celulares que tienen lugar y diseñar terapias mejoradas basadas en ese conocimiento. Será de particular importancia, dado el escaso conocimiento actual, dirigir esfuerzos encaminados a la identificación de proteínas que interaccionan con cisplatino y que como consecuencia se ven alteradas, pudiendo perder su funcionalidad y participando en el desencadenamiento de los procesos celulares citotóxicos. A este respecto la Química Analítica se perfila como una valiosa herramienta para ahondar en el conocimiento de las especies de platino presentes durante las terapias con fármacos de platino.

2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN METALÓMICA

2.1. Metales en sistemas biológicos y metalómica

En la que puede considerarse la era post-genómica, tras grandes hitos como la secuenciación del genoma completo del primer organismo (*Haemophilus influenzae*) en 1995 o la finalización del proyecto genoma humano en 2000, se plantea como nuevo reto el hecho de llegar a comprender las conexiones funcionales entre los genes, las proteínas, los metabolitos y los iones minerales. Como resultado, han surgido numerosas disciplinas “ómicas” con el objetivo de analizar diversas clases de componentes de un organismo vivo en su conjunto. El genoma de un organismo contiene la información que permite predecir la secuencia de la totalidad de las proteínas que podrán (o no) expresarse en él. La proteómica se centra en el estudio del conjunto de proteínas producidas en una célula, tejido u organismo, su localización, estructura, estabilidad e interacción. Por otro lado, la metabolómica tiene por objeto el estudio del conjunto de metabolitos producidos como resultado de reacciones catalizadas por ciertas enzimas. Además, para caracterizar un sistema biológico será necesario también abordar el estudio de sus especies metálicas.

Los iones metálicos son componentes fundamentales de la química de la vida. De hecho, se estima que un tercio de las proteínas requieren para ejercer sus funciones un cofactor metálico (bien como un ion simple o como un compuesto de coordinación metálico, tal como el grupo hemo (que incluye un átomo de Fe) o la metilcobalamina (vitamina B₁₂, que incluye un átomo de Co), o incorporado covalentemente como la selenocisteína (SeCys) en la glutatión peroxidasa). De esta manera, ciertos elementos (Fe, Cu, Co, Zn, Mo, Mn, K, Na, Ca, V, Cr, Ni, Se, B) desempeñan un papel esencial o beneficioso en el crecimiento vegetal, y en la salud y nutrición humana bajo determinados niveles de concentración; pudiendo conducir a diversos trastornos el exceso o déficit en los niveles de estos elementos. Así, en el caso de la enfermedad de Wilson, el Parkinson o el Alzheimer, existe una relación con la aparición de depósitos metálicos, mientras que en el caso de la enfermedad de Menkes, se establece como causa la deficiencia de cobre debido a mutaciones en el gen ATP7A. Por otro lado, otros elementos son potencialmente tóxicos (Cd, Hg, Pb) y los organismos vivos requieren mecanismos homeostáticos para regular sus niveles intracelulares. Por tanto, la vida de un organismo depende de forma crítica de la entrada, asimilación, distribución y translocación celular de los metales traza. Así, los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos para la obtención de nutrientes metálicos y metaloides, su uso o almacenamiento en compartimentos celulares y para regular su abundancia

intracelular con objeto de evitar una acumulación excesiva y su consiguiente toxicidad. Sin embargo, para entender la función biológica de un elemento en la naturaleza es necesario tener en cuenta sus especies, dependientes de su estado de oxidación y forma química en que se encuentre (libre o formando un compuesto organometálico o complejado con un bioligando). De la forma en que se encuentren dependerá también el carácter esencial o tóxico de los elementos. En general, se denomina especiación a la distribución de un elemento entre especies químicas definidas en un sistema.

Aunque el término metaloma fue inicialmente propuesto por Williams para referirse a la distribución elemental, concentraciones en equilibrio de iones metálicos libres o el contenido de metal libre en un compartimento celular, célula u organismo;²⁰³ su concepto se extendió posteriormente para englobar a la totalidad de especies de metales y metaloides que se encuentran en una célula o tejido.²⁰⁴ Por tanto, el concepto metaloma incluye tanto a sus especies inorgánicas metálicas (ionoma), como a sus complejos con proteínas (metaloproteoma), sus compuestos formados con metabolitos (metalometaboloma) e incluso otros complejos de coordinación con ADN, ARN, o carbohidratos. El metaloma puede determinarse en una muestra representativa del sistema o en una localización específica. Además puede caracterizarse con diferentes grados de aproximación, bien respecto al total de concentraciones elementales, el conjunto de complejos metálicos con cierto tipo de ligandos (por ejemplo, proteínas) o el conjunto de especies de determinado elemento. Al igual que el proteoma o el metaboloma, su descripción nunca puede ser completa y todos los posibles complejos metálicos sólo pueden describirse en términos de constantes cinéticas con un equilibrio termodinámico definido. Dentro de las especies metálicas presentes en sistemas biológicos, las más abundantes son las originadas con proteínas y metabolitos. Conviene matizar la diferencia entre metaloproteínas (aquéllas cuya función es otorgada por un metal al que se unen) y proteínas que ligan metales, que consisten en un complejo metálico generado debido a un equilibrio termodinámico y donde el metal no presenta ninguna función determinada.

Por analogía a las disciplinas -ómicas, el término metalómica, fue acuñado por Haraguchi en 2002, y se refiere al estudio cualitativo y/o cuantitativo del metaloma.²⁰⁵ Un estudio en metalómica comprende tanto un enfoque en los metales o metaloides en el contexto biológico, como la búsqueda de la conexión entre los niveles metálicos y su especiación con el genoma, el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma; y asimismo, la interpretación del papel desempeñado en el sistema de las especies metálicas identificadas. Por otra parte, de la misma forma, se hablará de metaloproteómica o de metalometabolómica para referirse a los estudios del metaloproteoma o del metalometaboloma, respectivamente.

Las áreas de interés para la realización de estudios metalómicos incluyen, en primer lugar, el estudio de las enzimas que requieren un metal para efectuar su actividad catalítica en los seres vivos. Por otro lado, existe también interés en establecer la relación entre los metales en el medio ambiente (atmósfera, océanos) y el genoma y proteoma de los seres vivos. A lo largo del proceso evolutivo, los organismos se han adaptado al medio para obtener los elementos imprescindibles, para proteger su química citoplásmica y para detectar, utilizar o transformar y defenderse de ciertos metales en el medio ambiente, lo cual también puede implicar cambios en la expresión de sus proteínas. Otro campo de interés es el vegetal, siendo importante determinar la movilización de metales del suelo hacia las plantas y su distribución interna, algo de relevancia, por ejemplo, en el caso de la fitorremediación de suelos. También se aplican en estudios de especiación en el área de alimentos enriquecidos en un elemento esencial (alimentos funcionales), como el selenio, con objeto de determinar sus formas químicas y su biodisponibilidad, además del transporte y evolución metabólica en los organismos que lo consuman. Por último, un campo muy importante en metalómica es el clínico. Por un lado, como se introdujo, los niveles inadecuados de metales o la presencia de ciertos elementos pueden estar relacionados con la aparición de enfermedades. Por otro lado, existe una serie de fármacos que contienen un metal en su estructura (metalodrogas), como los antitumorales de platino o rutenio, antiartríticos de Au, gástricos de Bi. En tal caso, será primordial estudiar su metabolismo, transporte e interacciones con biomoléculas.

2.2. Estrategias generales en metalómica y problemática

Es posible aplicar diversos niveles de aproximación y estrategias analíticas a la hora de abordar estudios metalómicos. Existen algunos métodos para la predicción de metalobiomoléculas, tales como: 1) Los basados en el aislamiento de moléculas con capacidad de ligar metales mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC), seguido de la identificación de las mismas; o 2) Los centrados en el empleo de herramientas bioinformáticas, que permiten proponer metaloproteínas en base a la búsqueda en bases de datos proteicas o genómicas de motivos o patrones de unión a metales conocidos, como secuencias de aminoácidos o secuencias genómicas; o incluso en base a las estructuras 3D de las proteínas podrían predecirse sitios de unión de metales en las mismas. Sin embargo, aunque estos métodos pueden ser de utilidad, sólo permiten proponer potenciales metalobiomoléculas, sin garantizar su presencia o existencia *in vivo*, lo cual siempre requiere una confirmación. Por esta razón, la mayoría de los estudios en metalómica se centran en el análisis de metales y metalocompuestos en muestras biológicas.

Tal y como se introdujo en la sección 2.1., los estudios metalómicos en muestras biológicas pueden centrarse en la determinación de contenidos totales de los metales y su distribución y localización en los fluidos, órganos, tejidos y compartimentos celulares, como preámbulo de un posterior estudio más específico centrado en la identificación y cuantificación de las especies metálicas (todas o determinado tipo, por ejemplo, metaloproteínas) presentes en ellos. Para abordar todos estos estudios, generalmente será necesario afrontar la elevada complejidad de las muestras, con una matriz orgánica constituida por una alta diversidad de biomoléculas y con muy amplios rangos dinámicos de concentración, que se reflejarán en los métodos de preparación de la muestra y en las estrategias a seguir para su análisis instrumental, que frecuentemente requerirán métodos de separación multidimensionales de alta resolución. En todo caso, es fundamental proponer métodos de análisis que presenten un coste y un tiempo de ejecución razonables.

En los estudios en metalómica, especialmente durante los análisis de especiación, será imprescindible afrontar varias limitaciones: 1) Las bajas concentraciones de especies metálicas en los sistemas biológicos, lo que hará necesario el empleo de técnicas de alta sensibilidad y selectividad para su detección, e incluso el aislamiento y preconcentración de dichas especies particulares a lo largo del método de análisis. 2) La labilidad del enlace metal-biomolécula, que habrá de ser mantenido durante el proceso analítico, y por tanto exigirá condiciones que permitan su conservación durante las etapas de preparación de la muestra, los procesos de separación aplicados y la determinación de las especies. 3) El riesgo de transformación de las especies durante el almacenamiento y preparación de muestra y el proceso de análisis. Por otro lado, un factor importante durante estos análisis será el auténtico “marcaje” que supone la presencia del metal en las biomoléculas, algo que, como se verá, será clave en su detección específica.

En las siguientes secciones se tratarán detalladamente otros aspectos concretos para las diferentes aproximaciones en los estudios metalómicos y su problemática.

2.3. Análisis de la composición elemental y técnicas de bioimagen en muestras biológicas

2.3.1. Determinación de contenidos totales elementales en muestras biológicas

El análisis del contenido total elemental de una muestra biológica (fluidos como sangre, suero, orina; una sección de tejido, órgano, etc.) puede realizarse en algunos casos de forma directa o, generalmente, previa mineralización de la misma con objeto de poner en disolución los metales y eliminar la matriz orgánica (por ejemplo, por tratamiento con ácidos y oxidantes, muy

frecuentemente con mezclas $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$, asistido por microondas o calentamiento en una estufa), empleando técnicas atómicas sensibles y selectivas para la determinación elemental a nivel de trazas. Sin duda, la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es la técnica más poderosa y adecuada en la actualidad para este fin, debido a: sus bajos límites de detección ($\text{sub-ng}\cdot\text{L}^{-1}$), prácticamente independientemente de la forma química en que se encuentren los elementos y de la matriz de la muestra; su capacidad de determinación multielemental y multiisotópica; y su elevado rango dinámico (10^9). Estas características la convierten en la técnica de detección elemental de elección para multitud de estudios,²⁰⁶ habiendo desplazado a otras como la espectroscopia de emisión atómica con fuente de ICP (ICP-AES), la fluorescencia de rayos X (XRF) o el análisis por activación neutrónica instrumental. Además, como se verá más adelante, su fácil acoplamiento a multitud de técnicas de separación la convierten en una herramienta fundamental en los estudios en metalómica.

El principio de funcionamiento del ICP-MS consiste en la generación de iones elementales (en una fuente de plasma a presión atmosférica) a partir de los componentes de la muestra, su conducción a través de una interfase y un sistema de lentes iónicas, su separación según su relación masa/carga en un analizador de masas a alto vacío, seguida de su detección. El plasma consiste en un gas altamente ionizado ($>1\%$) y conductor de la electricidad, que presenta una temperatura elevada (5000-8000 K) y es generado en una antorcha de cuarzo utilizando generalmente Ar como gas plasmógeno, bajo la acción de una bobina de radiofrecuencias. El esquema de sus componentes más frecuentes se muestra en la Figura 12.

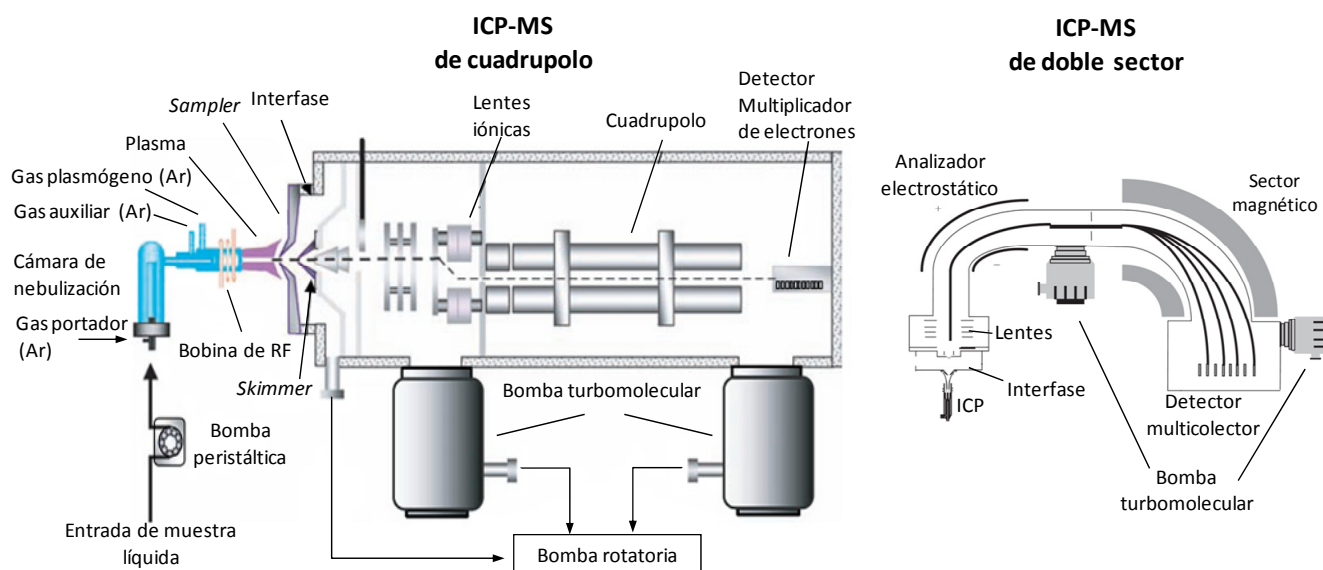


Figura 12. Esquema y componentes típicos de un ICP-MS de cuadrupolo y doble sector.

En el caso de muestras líquidas, suele utilizarse para introducir la muestra un sistema de aspiración y un nebulizador, seguido de una cámara de nebulización refrigerada, haciendo llegar un fino aerosol líquido a través del canal central de la antorcha al plasma de argón. En el interior del plasma, la muestra es desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada. El desarrollo en los últimos años de nebulizadores para micro- y nano-flujos permite el análisis de muestras al nivel de micro y submicrolitros, con introducción en sistema continuo o en modo de inyección en flujo (FIA). Sin embargo, existen también otros sistemas efectivos de introducción de muestra al plasma tales como la ablación láser (LA). Con todo ello, se ha llegado a determinar ultratrazas de Pt (con límites de detección del orden de partes por trillón, ng L^{-1}) en orina, sangre, plasma sanguíneo, plasma ultracentrifugado, suero, ADN y tejidos animales.²⁰⁷

Para introducir los iones generados en el plasma a presión atmosférica a la región de alto vacío, se emplea un sistema de conos (“*sampler*” y “*skimmer*”), entre los cuales existe una región de presión reducida (10^{-3} - 10^{-4} bar). Los iones se extraen por gradiente de presión a través de sus orificios y se transmiten hacia un sistema de lentes electrostáticas, donde se focaliza el haz, se separan las especies neutras y se disminuye el intervalo de dispersión de energía de los iones. A la salida del sistema de lentes, los iones llegan a un analizador de masas.

Los analizadores de masas separan los iones en función de su relación masa/carga (m/z), para lo que requieren un camino libre de colisiones, que se consigue mediante presiones suficientemente bajas (10^{-8} - 10^{-9} bar). Los más habituales para ICP-MS son de tipo cuadrupolo (Q), que proporcionan una resolución de entorno a $m/\Delta m$ 400 (una unidad de masa), y una elevada capacidad multielemental en la escala de tiempo. Sin embargo, la técnica sufre de interferencias isobáricas y poliatómicas para un número considerable de isótopos. La eliminación de éstas es fundamental y para ello se puede acudir o bien a un analizador de doble sector (“*Sector Field*”, SF) que ofrece resolución suficiente, en la mayoría de los casos, (hasta $m/\Delta m$ 10000) para distinguir las masas del analito y de la interferencia; o bien a un ICP-MS que esté provisto de una celda de colisión o de reacción y que, por tanto, permita eliminar las interferencias poliatómicas, como en el caso de Fe, V, Cr, As o Se. Es de destacar que los instrumentos con SF operados en modo de baja resolución ($m/\Delta m$ 300-400) permiten obtener un incremento de sensibilidad con respecto a los de cuadrupolo de hasta dos órdenes de magnitud, siendo únicamente problemático el hecho de mantener los niveles de blanco suficientemente reducidos para poder explotar esas capacidades instrumentales. Sin embargo, estos analizadores tienen una menor capacidad multielemental que los de cuadrupolo, al requerir tiempos de integración mayores cuando se precisa del escaneado en una ventana de masas extensa. Este problema puede solucionarse empleando un detector multicolector de iones.²⁰⁸

2.3.2. Técnicas de bioimagen elemental en tejidos y células

En los últimos años se ha abordado el análisis cuantitativo directo (con una mínima preparación de muestra) de la distribución espacial elemental en una muestra sólida, tal como una sección delgada de tejido biológico, empleando técnicas microanalíticas de imagen elemental. Esta posibilidad es de enorme interés, dado que proporciona información detallada y de alta fiabilidad sobre la localización precisa y cuantitativa de los metales en los sistemas biológicos y abre la puerta a la selección de regiones y muestras de interés para efectuar estudios subsiguientes metalómicos centrados en la identificación de complejos metal-biomoléculas. Atendiendo a su resolución espacial y a su sensibilidad, las tres técnicas de bioimagen elemental más empleadas para este fin son la fluorescencia de rayos X con radiación de sincrotrón (SXRF), la espectrometría de masas de ión secundario (SIMS) y la ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS (LA-ICP-MS).

La microscopía de SXRF²⁰⁹ emplea un haz de rayos X para excitar los electrones de la capa interna atómica y, como consecuencia, generar fluorescencia de rayos X. Dado que cada elemento presenta un espectro diferente de fluorescencia, se trata de una técnica no destructiva multielemental, cualitativa y cuantitativa que proporciona información acerca de la localización y el estado de oxidación de cationes metálicos. Presenta límites de detección que pueden alcanzar los $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ en secciones biológicas, con una resolución del orden de $0,1\text{-}1 \mu\text{m}$. De hecho con el desarrollo de una nanosonda para SXRF (nano-SXRF) en la unidad de radiación sincrotrón europea, se ha llegado a emplear un haz de rayos X de 90 nm . Por otra parte, SIMS²¹⁰ es una técnica de análisis de superficies que permite obtener imágenes cuantitativas de elementos, isótopos o moléculas, así como el análisis en profundidad y la determinación elemental a nivel de trazas. En este caso, los componentes de la superficie son “levantados” durante el bombardeo con un haz iónico primario focalizado. Los iones secundarios generados en ese proceso son posteriormente extraídos hacia un espectrómetro de masas, de Q, SF o de tiempo de vuelo (TOF), y finalmente detectados. SIMS operado en modo dinámico presenta límites de detección elemental en secciones biológicas de nm , de alrededor de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ con una resolución de $0,1\text{-}1 \mu\text{m}$. Sin embargo, con el desarrollo de nano-SIMS, además se puede alcanzar una resolución de hasta 50 nm empleando un haz primario de iones de Cs. Las resoluciones proporcionadas tanto por nano-SXRF como nano-SIMS abren la posibilidad de estudiar distribuciones elementales a nivel de orgánulos subcelulares. Por ejemplo, se ha estudiado la distribución de Fe y otros elementos en neurovesículas de dopamina liofilizadas empleando nano-SXRF.²¹¹ Con esta misma técnica también se estudió la distribución multielemental en

neuromelanina humana.²¹² Incluso utilizando SIMS con una resolución de 500 nm se obtuvieron distribuciones metálicas subcelulares en células liofilizadas de glioblastoma humano²¹³ y permitió el estudio de la distribución subcelular de Al e In en riñón de rata.²¹⁴ También es de destacar el empleo de SXRF para estudiar la distribución de platino en diversos modelos celulares tratados con cisplatino. Tal es el caso de líneas celulares humanas de carcinoma microcítico de cabeza y cuello,²¹⁵ o de adenocarcinoma de ovario (demostrando la entrada reducida del fármaco en líneas celulares resistentes),²¹⁶ o células de carcinoma epidermoide, en las que se demostró el secuestro del compuesto en melanosomas.¹²⁶ Otras técnicas de imagen basadas en el uso de rayos X son la emisión de rayos X inducida por micropartículas (PIXE) y la espectroscopía de absorción de rayos X (XAS), que aun siendo menos sensibles que SXRF, también se han aplicado para el análisis de la distribución de Pt a nivel de bajos μm en células humanas de cáncer de pulmón,²¹⁷ de adenocarcinoma de ovario,²¹⁸ o en otras líneas celulares en las que se demostró la reducción del Pt (IV) a Pt (II) en el interior celular.^{219, 220}

En el caso de la técnica de LA-ICP-MS,²²¹ se utiliza un haz láser focalizado, con un diámetro de haz del orden de micrómetros, para producir la ablación del material sólido biológico a analizar. A continuación ese material es transportado hacia el plasma de un ICP-MS empleando He o Ar como gas portador, donde se producirá su atomización, ionización y detección. En la Figura 13 se muestra un esquema del modo de operación de LA-ICP-MS.

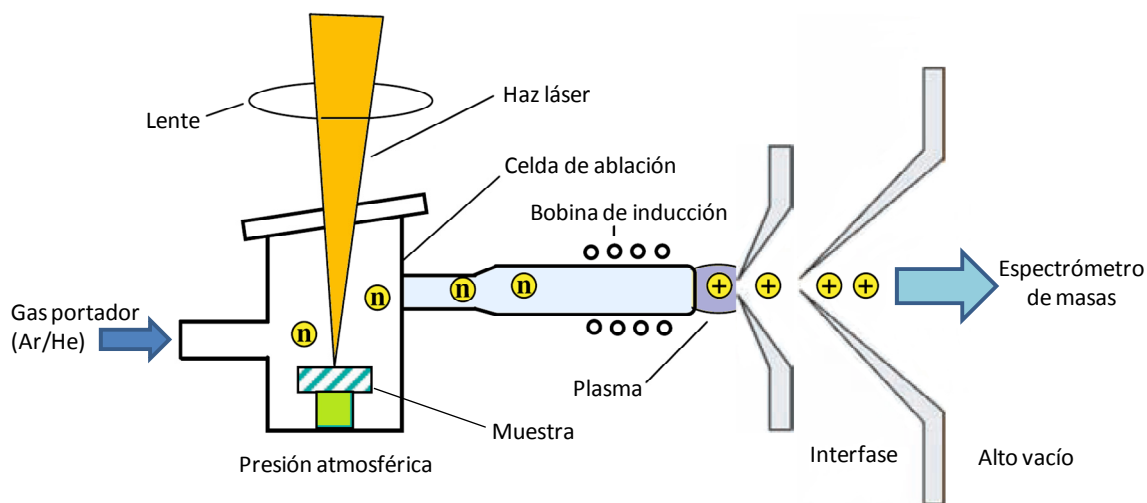


Figura 13. Esquema de la ablación láser como método de muestreo en ICP-MS. Adaptado de Becker.²²²

La resolución espacial de LA-ICP-MS puede ser de 5-200 μm , que es insuficiente para obtener un mapa de distribución elemental a nivel subcelular, pero sí es adecuada para el estudio de distribuciones en subestructuras de tejidos. De hecho, la alta sensibilidad de LA-ICP-MS, con

límites de detección de $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ (inferiores a los obtenidos con SIMS o SXRF), su capacidad multielemental, y que la instrumentación asociada es más económica y accesible que las otras, hacen que LA-ICP-MS sea la técnica más frecuentemente utilizada en los últimos años para obtener bioimágenes elementales en secciones de tejidos.²²³ Es interesante destacar que, bajo condiciones de plasma seco, se reduce considerablemente los problemas de interferencias (principalmente la formación de óxidos) que aparecen durante el uso de ICP-MS con nebulización en disolución.

LA-ICP-MS puede considerarse aún una técnica semi-cuantitativa dada la falta de materiales de referencia certificados y la dificultad de producción de patrones para la cuantificación. No obstante, en los últimos años se han propuesto diversas estrategias para cuantificar muestras biológicas, tales como: el empleo de patrones homogéneos con una matriz análoga o similar a la muestra (*matrix-matched*) enriquecidos en ciertos elementos,²²⁴⁻²²⁶ o la calibración en disolución.²²⁷ El empleo de un patrón interno inherente a la muestra es también recomendable, y en ciertos casos se ha propuesto el empleo de ^{13}C con éxito.²²⁸ La necesidad de conseguir la ablación de suficiente cantidad de material para un análisis sensible y para evitar efectos de fraccionamiento, obteniendo resolución a nivel de μm , requiere el uso de láseres con una densidad de potencia superior a 10^9 W cm^{-2} .

Los tejidos a analizar pueden ser congelados, crio-seccionados²²⁹ (en láminas generalmente de $5\text{-}20 \mu\text{m}$) y analizados en una celda de LA convencional, una vez secos a temperatura ambiente; o en una criocelda.²³⁰ Si bien el grado de manipulación de la muestra es muy reducido siguiendo este método, lo que supone un bajo riesgo de alteración del tejido en cuanto a distribución y contenidos metálicos, dichas muestras son complicadas de preparar y de transportar. Otra alternativa empleada es la utilización de tejidos fijados en formalina y emparafinados, más sencillos de almacenar y trasladar, que previamente a su análisis son seccionados con un microtomo.²³¹ En este caso, con objeto de evitar la contaminación de la fuente de iones del espectrómetro de masas, es recomendable el desparafinado del tejido previo al análisis. Ambos tipos de preparación de la muestra también son compatibles con SXRF o SIMS.²²³

Mediante el empleo de LA-ICP-MS se ha estudiado la distribución de diversos elementos tanto endógenos como exógenos en multitud de secciones de tejidos de relevancia clínica y médica. Tal es el caso de Cu y Zn en tejidos tumorales como glioblastoma humano²³² o cerebro de rata.²³³ También se ha estudiado la distribución multielemental en corazón de ratón,²³⁴ en placas amiloides cerebrales asociadas al alzheimer,²³⁵ en diversas secciones de cerebro humano y de rata,^{225, 227, 229, 232, 233, 236-239} (incluso permitiendo la generación de mapas de distribución 3D en

cerebro),²⁴⁰ en melanoma de nódulos linfáticos,²⁴¹ o en depósitos de fosfato cálcico de rodilla de pacientes artríticos.²⁴² Asimismo se ha aplicado para el análisis de la composición elemental en hojas²⁴³ o en secciones de un organismo completo como el crustáceo *Daphnia Magna*²³¹ o en una babosa.²⁴⁴ Incluso se ha empleado para estudiar la acumulación de un elemento exógeno como el Pt en un modelo de riñón de ratón tratado con cisplatino²⁴⁵ o en cerebro de rata tratada con carboplatino.²²⁴ Los tiempos de análisis de tejidos biológicos pueden oscilar en función del tamaño de la muestra, velocidad de barrido del láser, y diámetro del haz láser aplicado, pudiendo llegar a varias horas.

Con objeto de aumentar la resolución lateral de LA-ICP-MS hasta la escala de los nm, recientemente se ha propuesto la técnica de nano-LA-ICP-MS, que puede conseguirse haciendo uso de una delgada aguja de Ag insertada en un haz láser desenfocado, generando el efecto de campo cercano (*near field*) en la ablación láser. De esta forma, se consigue un enfoque muy efectivo de los fotones y se traduce en un aumento sensible en la resolución, en el rango de los cientos de nm.²⁴⁶ Por otro lado, también se ha propuesto el acoplamiento de la microdissección láser a ICP-MS (LMD-ICP-MS)^{247, 248} para generar imágenes elementales con una resolución de unos pocos μm en secciones cerebrales. Estas técnicas, aunque son prometedoras para el análisis a nivel celular, se encuentran aún en proceso de desarrollo.

2.4. Análisis de especiación de biomoléculas ligadas a metales

Para la detección, identificación y cuantificación de las metalo-especies presentes en una muestra biológica será necesario acudir al uso de técnicas analíticas sensibles y selectivas que produzcan una señal específica de éstas y que proporcionen información estructural. Dado que cualquier extracción del analito de su medio original supone un riesgo de alteración de su identidad, será preferible aplicar técnicas que posibiliten la determinación directa en la muestra o con el menor grado de preparación.

La determinación directa podría abordarse en una muestra sólida sencilla mediante XAS, que proporciona información acerca del estado de oxidación y de la coordinación del metal. Sin embargo, su baja sensibilidad y el requerimiento de una gran pureza en la composición de la muestra hacen que sus aplicaciones sean limitadas. Además, la identificación está supeditada a la comparación de espectros de la muestra con los de compuestos de referencia. Se ha empleado en la determinación de la distribución cuantitativa de Zn entre complejos con fosfato, cisteína e histidina en plantas,²⁴⁹ para la identificación de citrato como ligando principal de níquel en hojas de *Leptopla*²⁵⁰ o para la determinación de complejos metálicos con proteínas a gran escala.²⁵¹

Asimismo podría plantearse la aplicación de diversas técnicas para el análisis directo en disolución de extractos de muestra, como la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masas (MS) molecular (con ionización por electronebulización (ESI) o ionización por desorción mediante láser asistida por una matriz (MALDI)) o incluso la espectroscopia óptica (ultravioleta-visible (UV-VIS), infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), Raman, fluorescencia, dicroísmo circular).²⁵² Sin embargo, la aplicación directa de estas técnicas lleva intrínseca una falta de sensibilidad y selectividad, que impide el estudio efectivo en la mayoría de los casos que suele plantear el estudio de muestras complejas.

Así, generalmente, en los análisis de especiación de metal-biocompuestos en muestras biológicas, la metodología analítica ha de afrontar problemas como la baja concentración de los analitos (niveles traza) y la complejidad de la matriz (con múltiples componentes). Para atender a estos problemas, en la mayor parte de los casos será necesario abordar el estudio acudiendo al empleo de técnicas acopladas, que constarán de métodos de separación multidimensionales de alta resolución de las especies (combinando técnicas separativas ortogonales), seguidos del empleo sinérgico y combinado de técnicas de espectrometría de masas, tanto elementales como moleculares, que proporcionan información complementaria, para la detección, identificación y caracterización de las especies metal-biocompuesto, tras su separación y aislamiento.²⁵³ En la Figura 14 se esquematizan las principales técnicas acopladas disponibles para realizar análisis de especiación elemental, que se tratarán con detalle en la sección 2.4.2.

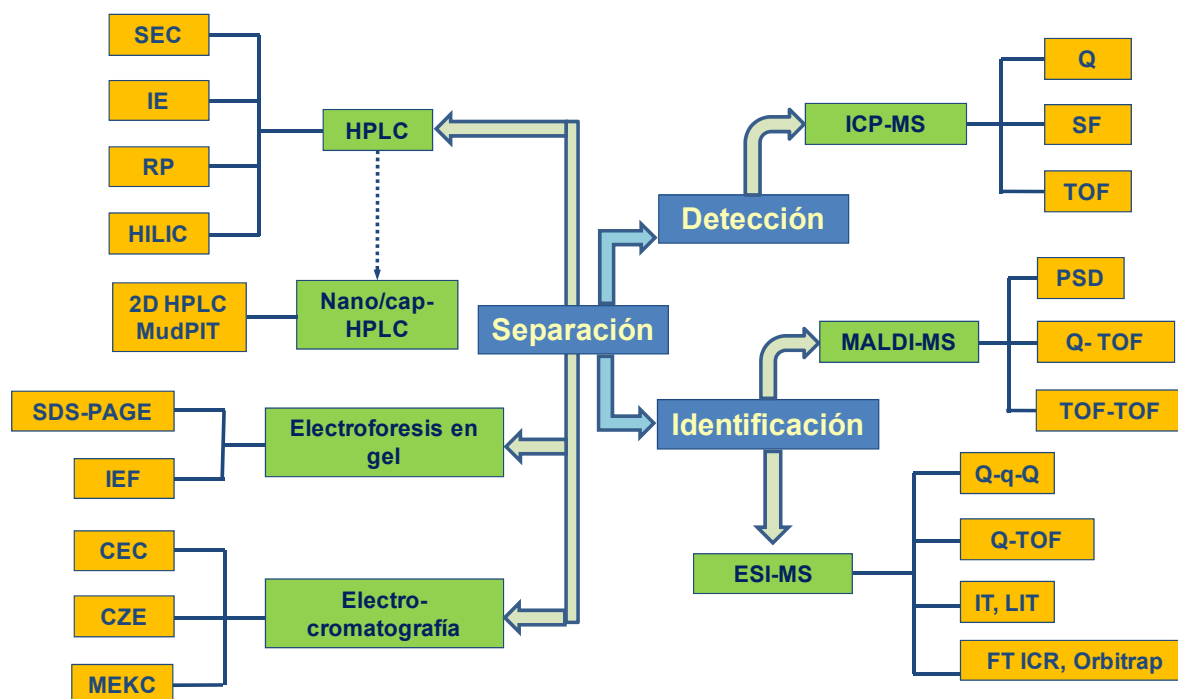


Figura 14. Principales técnicas analíticas acopladas disponibles para análisis de especiación elemental.

2.4.1. Espectrometría de masas molecular para la determinación estructural de los complejos metal-biomoléculas

El análisis estructural de biomoléculas por espectrometría de masas requiere técnicas que sean capaces de ionizarlas sin fragmentarlas y a continuación de separarlas en un espectrómetro de masas que presente un rango de masas apropiado, con un detector adecuado y que ofrezca buena sensibilidad y precisión para la determinación de sus masas moleculares. Entre las técnicas de ionización suave, dos se han convertido en métodos habituales para el análisis de biomoléculas: MALDI y ESI. Ambas permiten estudiar moléculas orgánicas complejas de alto o bajo peso molecular, por tanto serán adecuadas para el análisis de proteínas, péptidos, metabolitos, nucleótidos, glúcidos o lípidos. Para su aplicación en metalómica, además deberán preservar la identidad de las especies metal-biomolécula analizadas y el enlace metálico original. La determinación de las masas exactas de las moléculas analizadas, sus espectros de fragmentación, además de los perfiles isotópicos asociados a las moléculas, variables en función de la presencia de un heteroátomo con una distribución isotópica peculiar, como el platino, selenio, mercurio, etc.; serán fundamentales para identificar los compuestos metal-biomolécula.

2.4.1.1. Espectrometría de masas MALDI-MS

MALDI es un método de ionización suave basado en el empleo de una matriz en la que se dispersa la muestra a analizar y que facilita la ionización indirecta de los analitos. Esta matriz, que debe absorber fuertemente a la longitud de onda del láser empleado (por ejemplo, un láser pulsante de N₂ con λ de 337 nm), se co-cristaliza (relación molar matriz:analito más de 1000:1) con la muestra y se irradia con el láser pulsante (pulsos de láser de 1 a 100 ns). Tras la irradiación, las moléculas de matriz absorben energía y pasan al estado gaseoso, arrastrando a las moléculas de analito con ellas. En este proceso, se desorben y vaporizan moléculas neutras, iones positivos y negativos de matriz y moléculas neutras de analito. La ionización de las moléculas de analito transcurre en fase gaseosa, donde se produce la transferencia de carga entre matriz y analito. En el proceso se generan iones principalmente de carga +1, con nulo o escaso grado de fragmentación de los analitos (menos que con ESI), siendo también menos sensible a los efectos de matriz que ESI. Los iones producidos son entonces extraídos de la fuente de ionización y, aplicando un potencial de extracción, son conducidos al espectrómetro de masas (Figura 15).

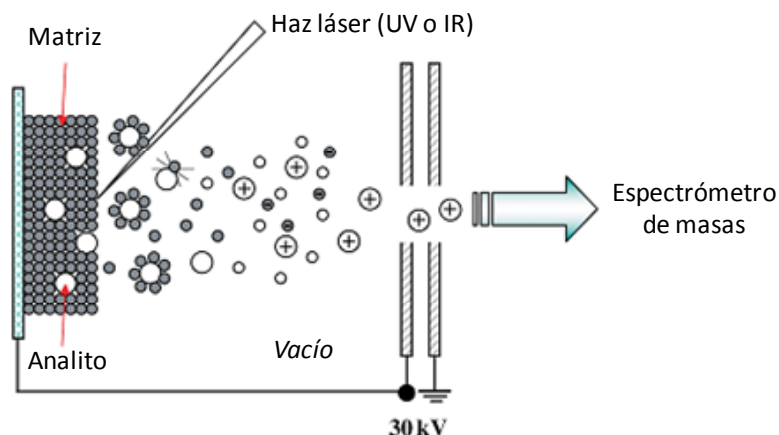


Figura 15. Mecanismo de ionización en MALDI. Adaptado de Becker.²²²

La elección de la matriz depende de la naturaleza del producto a analizar. Entre las más empleadas se encuentran: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), para el análisis de péptidos o proteínas por debajo de 10 kDa; ácido sinapínico, para el análisis de proteínas o péptidos grandes, por encima de 10 kDa; ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), utilizado para el análisis de moléculas pequeñas, fosfopéptidos, péptidos, carbohidratos neutros y algunos polímeros sintéticos; ácido 2-(4-hidroxifenilazo)-benzoico (HABA), para el análisis de proteínas y lípidos; 2,4,6-trihidroxiacetofenona, generalmente para oligosacáridos. Suelen prepararse en un medio orgánico (mezclas agua:acetonitrilo/acetona/metanol) conteniendo también un ácido volátil que sea capaz de proporcionar los H^+ necesarios para la ionización, como el ácido trifluoroacético (TFA), siendo el ácido fórmico (FA) menos aconsejable por su inferior volatilidad.

Habitualmente se utiliza un analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF), que basa la determinación de masas en que los iones extraídos, con la misma energía cinética, emplean un tiempo proporcional a su m/z para recorrer un tubo de vuelo. TOF es idóneo para analizar los iones producidos por MALDI, ya que su funcionamiento es también pulsante y puede sincronizarse con el láser excitador. La Figura 16 muestra un esquema de la técnica MALDI-TOF.

Los sistemas TOF presentan un rango m/z teóricamente ilimitado, consiguen una elevada transmisión de iones generados en la fuente hacia el detector y, por tanto, son considerablemente sensibles. Sin embargo, su resolución es limitada, generalmente $m/\Delta m$ de 10000-20000, con una exactitud en la determinación de masas de 10-20 ppm. Los analizadores TOF que constan de un reflector pueden permitir el análisis de los productos generados por la fragmentación de biomoléculas para su caracterización estructural, mediante el método llamado PSD (Decaimiento post-fuente, *Post Source Decay*). Sin embargo, sus prestaciones y la calidad espectral son

limitados ya que no ofrece información sobre todas las rutas de fragmentación y el aislamiento del ion precursor presenta una baja resolución. Por tanto, para la fragmentación de biomoléculas ionizadas por MALDI generalmente se acudirá a otros instrumentos híbridos, tales como TOF-TOF o Q-q-TOF.

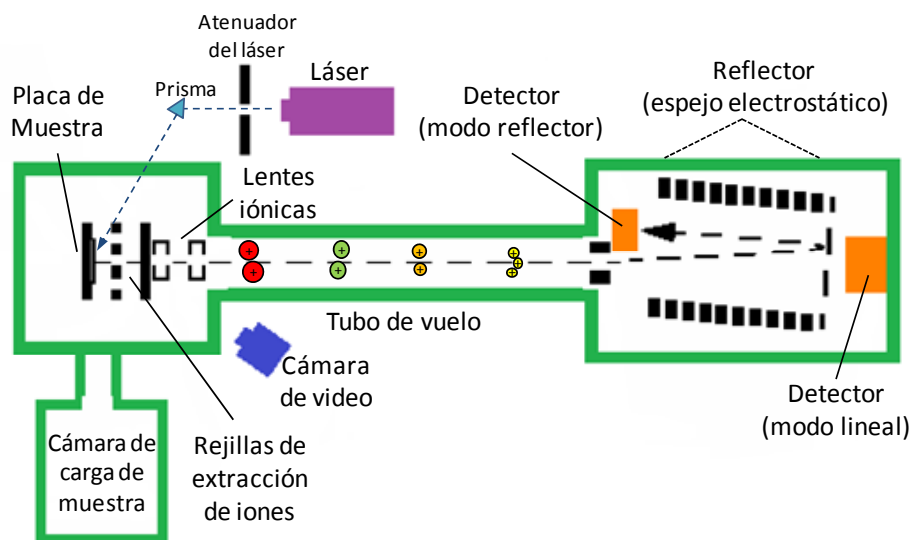


Figura 16. Esquema de un espectrómetro de masas MALDI-TOF

MALDI-TOF se utiliza en el análisis de proteínas, péptidos, glicoproteínas, polinucleótidos y, en general, grandes biomoléculas de hasta 200 kDa. Posee una sensibilidad de fmol en el caso de péptidos/proteínas. Presenta algunos inconvenientes como: su limitada resolución, posible formación de aductos por captación de pequeños fragmentos de matriz, y posible fragmentación del analito, conduciendo a errores en la asignación de masas. En los últimos años, MALDI-MS se ha propuesto además para análisis de imagen de biomoléculas aplicado directamente en secciones de tejido, preparadas de forma similar a las utilizadas para obtener imágenes elementales mediante LA-ICP-MS, sobre las que se depositaría la matriz.²⁵⁴

2.4.1.2. Espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS)

ESI es una técnica de ionización a presión atmosférica en la que una disolución de muestra se introduce a un caudal aproximadamente de $1\text{-}20\ \mu\text{L min}^{-1}$ a través de un capilar de acero inoxidable cuyo extremo se mantiene a un alto potencial (3-4 kV) con respecto a la pared frontal del espectrómetro de masas. La disolución que emerge del capilar se nebuliza formando gotas con una carga superficial muy elevada, que las hace estallar generando otras menores tras una rápida evaporación del disolvente. Llegado un punto, debido a la repulsión coulombica de cargas del mismo signo situadas en la superficie de la gota, se produce la eyección de iones

aislados de analito en fase gaseosa, solvatados por moléculas del disolvente. En la interfase con el espectrómetro de masas se produce la desolvatación total de los iones, que puede ser asistida por calentamiento a 150-250 °C o por una corriente de N₂ o aire. Estos iones se transportan desde la zona a presión atmosférica hasta el analizador de masas a alto vacío a través de una zona de presión reducida. En la Figura 17 se resume el proceso de ionización.

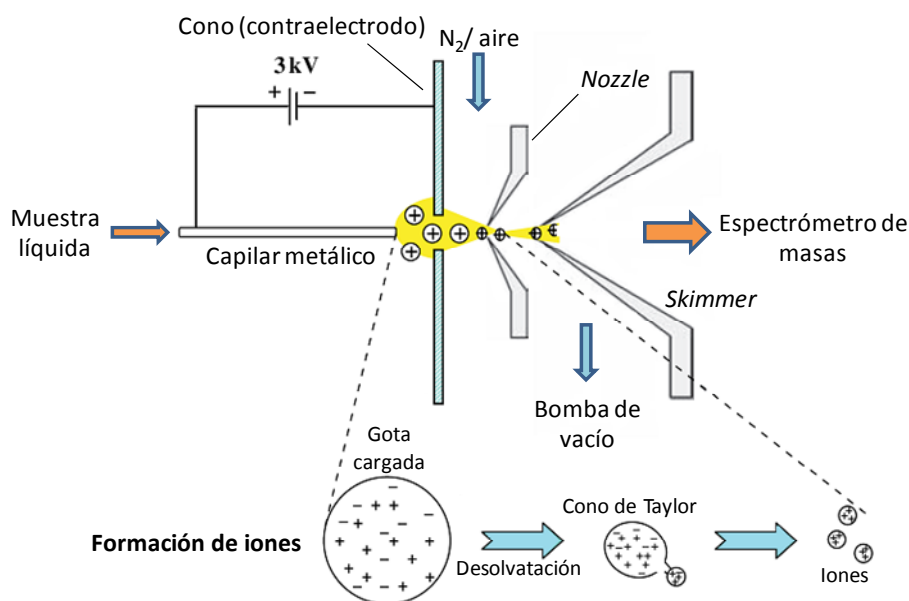


Figura 17. Esquema de un espectrómetro de masas ESI-MS. Formación de iones en ESI. Adaptado de Becker.²²²

El **nanospray** (nanoESI o nESI) es una versión miniaturizada de ESI que permite trabajar a caudales de nL min⁻¹. Para ello, se utiliza un capilar que tiene un recubrimiento metálico, con un orificio de salida de 1-3 μm, en lugar de los 100 μm de diámetro interno usuales en ESI. El espray se consigue empleando voltajes considerablemente más bajos (500-800 V) y no requiere un bombeo externo, ya que la disolución emerge a 10-20 nL·min⁻¹ del capilar por sí misma, produciendo gotas especialmente pequeñas. Tampoco requiere el uso de un gas de secado. El capilar suele situarse a 1-2 mm del orificio de la fuente, por lo que se mejora la eficiencia de ionización, desolvatación y transferencia. El consumo de muestra es muy reducido (pocos μL) y la sensibilidad que proporciona nESI es extraordinariamente alta (fmol) debido a la alta tasa de desorción de iones a partir de gotas pequeñas.

Mediante ESI son abundantes los iones de carga múltiple del tipo $[M+nH]^{n+}$ y $[M-nH]^{n-}$ y suelen detectarse series de iones moleculares que difieren en una unidad de carga. Al operar a presión atmosférica y a temperaturas no demasiado altas, la ionización es extremadamente suave, consiguiendo iones cuasi-moleculares intactos, evitando la rotura de enlaces covalentes. Esto lo convierte en un método de ionización muy apropiado para el análisis de proteínas, ya que

permite la conservación de los enlaces covalentes aunque pudiera afectar a los no covalentes, provocando la disociación en los correspondientes polipéptidos. Sin embargo, la eficiencia en el proceso de ionización es dependiente del compuesto y puede variar en función de la matriz.

ESI puede aplicarse para el análisis de péptidos, proteínas, pequeños oligonucleótidos, carbohidratos y biopolímeros. El límite de detección de la técnica es inferior a 10^{-15} moles y es aplicable para moléculas de hasta 150-200 kDa, pudiendo analizar iones positivos y negativos. Además, será muy adecuada para el acoplamiento LC-MS y CE-MS. Las muestras deben prepararse en medios acuosos-orgánicos y ácidos volátiles, para favorecer la generación del spray y la ionización. Es frecuente el empleo de mezclas agua:acetonitrilo/metanol conteniendo ácido fórmico o ácido acético. En este caso el TFA como ácido es desaconsejable por la supresión que produce en la ionización de otras moléculas.

Aunque ESI puede llevar asociados analizadores de masas tan sencillos como un Q o un TOF, en metalproteómica suele ser más útil y frecuente el empleo de trampas de iones.

2.4.1.3. Analizadores de masas de trampas de iones

Los analizadores de trampa de iones son los más extendidos para el análisis de proteínas. Entre estos, los más sencillos y económicos son la trampa de iones cuadrupolar (QIT) y la trampa de iones lineal (LIT), con mejores prestaciones que la primera. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un incremento en el acceso a otros instrumentos basados en otras trampas de iones de coste económico mucho más elevado como los analizadores de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR) y el recientemente desarrollado Orbitrap. Estos ofrecen mejores prestaciones en cuanto la elevada resolución obtenida, gran sensibilidad y gran exactitud en la determinación de masas, lo que les confiere también gran valor para estudios de proteómica y metabolómica.

Trampa de iones lineal (LIT, LTQ)

Una trampa de iones lineal (LIT, LTQ), se basa en la configuración de un cuadrupolo, cuatro barras paralelas que emplean potenciales de radiofrecuencias y de corriente continua para la separación y análisis de masas, al que se añaden dos electrodos en los extremos para poder actuar como una trampa de iones. Un diseño habitual (Figura 18) suele consistir en dos pares de barras hiperbólicas divididas en tres secciones. La sección central es tres veces más larga que las de los extremos y presenta rendijas a lo largo de dos de las barras opuestas para permitir la salida de iones y su detección, normalmente en multiplicadores de electrones. En cuanto a su

funcionamiento, los iones que entran se atrapan en la dirección axial (plano yz) aplicando voltajes de corriente continua (dc) a las tres secciones. Para la captura radial en el plano xy, se aplican potenciales de radiofrecuencias (rf). Además se aplica un voltaje de corriente alterna en los electrodos x para la activación de iones, aislamiento y expulsión. El análisis de los iones se realiza expulsándolos radialmente, secuencialmente en función de su m/z , a través de la variación del potencial rf, produciendo la salida de los iones a través de las rendijas del plano xz, y su detección.

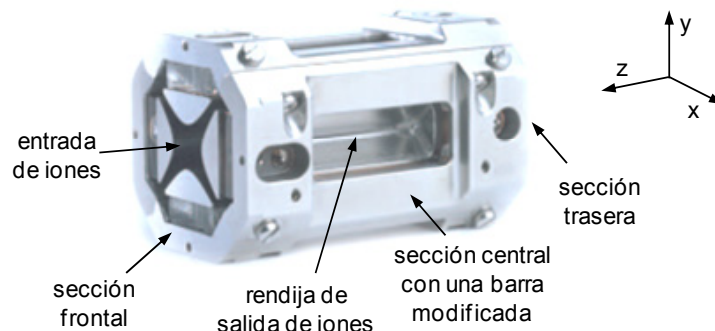


Figura 18. Esquema de una trampa de iones lineal.

Entre las ventajas de las LIT con respecto a la QIT, destacan la gran eficiencia de captura de iones inyectados, el mayor número de iones atrapables sin que se den fenómenos espacio-carga y su mayor velocidad de barrido. De esta forma, presenta mayor sensibilidad (nivel de fmol) e incluso mayor resolución que las QIT, 2000 en modo normal, y hasta 10000 cuando se emplea en modo Ultrazoom. Además presenta una exactitud en las masas de 100-500 ppm.

Analizador de resonancia iónica ciclotrónica por transformada de fourier (FT-ICR)

La espectrometría de masas con un analizador FT-ICR permite la determinación de masas exactas mediante la medida de la frecuencia de resonancia ciclotrónica de los iones. La medida se realiza en una célula cilíndrica (Figura 19) que se encuentra en el interior de un campo magnético homogéneo. Los iones se confinan en la célula mediante la aplicación de un campo eléctrico estático perpendicular al campo magnético y adquieren un movimiento circular con una velocidad angular (ω) que depende de la masa y la carga del ión y del campo aplicado. A continuación, aplicando un pulso de excitación de radiofrecuencias (efectuando un barrido de frecuencias), se modifica la ω de los iones, aumenta el radio de su trayectoria y describen una espiral. Cada ión emite una señal de radiofrecuencias característica en función de su m/z , que se recoge en un receptor, se amplía y aplicando la FT se convierte de una función en el dominio del tiempo en otra en el dominio de frecuencias, transformable a valores de m/z .

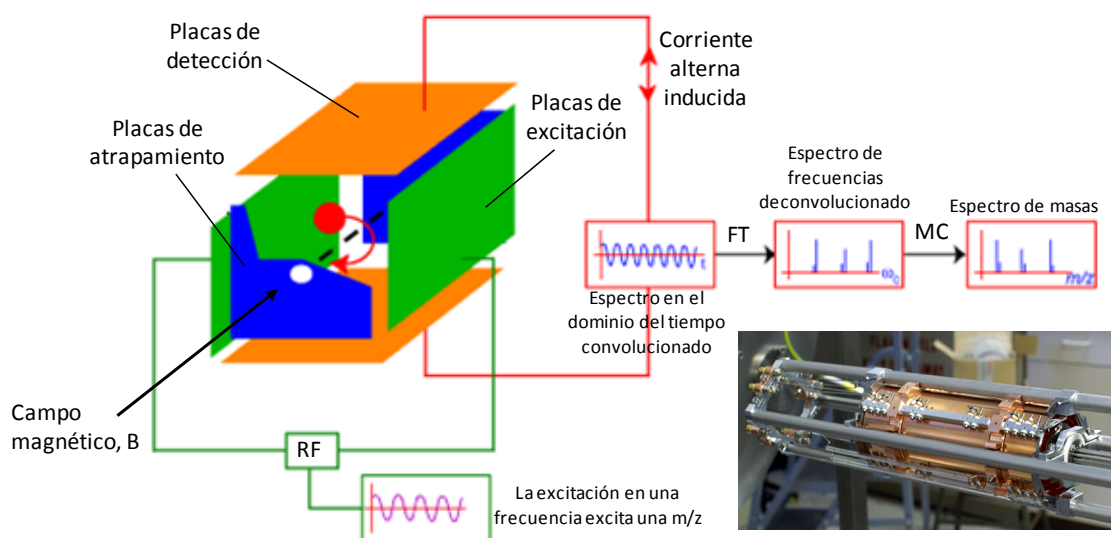


Figura 19. Esquema y funcionamiento de un analizador FT-ICR y fotografía de una celda ICR.

Los espectrómetros de masas de FT-ICR tienen un gran poder de resolución (50000-1000000) y una sensibilidad de fmol. La exactitud en la determinación de masas, inferior a 2 ppm, es superior a la de otros analizadores, por lo que esta técnica es muy apropiada para la determinación de masas exactas de iones moleculares y de fragmentos, aunque su velocidad de barrido es relativamente lenta comparada con la de una trampa de iones.

Orbitrap

El orbitrap constituye la última trampa de iones desarrollada (en el año 2000), que efectúa un atrapamiento orbital de iones alrededor de un electrodo central axial empleando un campo electrostático. Consiste en un eje axial que funciona como electrodo central y en un electrodo externo coaxial con forma de barril (Figura 20). Los iones atrapados rotan alrededor del electrodo central y sufren oscilaciones armónicas a lo largo de éste. La frecuencia de dichas oscilaciones depende de las m/z de los iones. De esta forma, empleando la FT, se podrá obtener el espectro de masas a partir de las frecuencias de oscilación de los iones. Este analizador permite obtener resoluciones de 30000-100000 (FWHM). Además, proporciona una gran exactitud en la determinación de masas, con errores de 2-5 ppm; gran capacidad espacio-carga y un elevado rango dinámico con respecto a otras trampas de iones y alta sensibilidad (fmol). Es muy frecuente la combinación con un LTQ dando lugar a un instrumento híbrido de gran interés en cuanto a sus aplicaciones en proteómica.

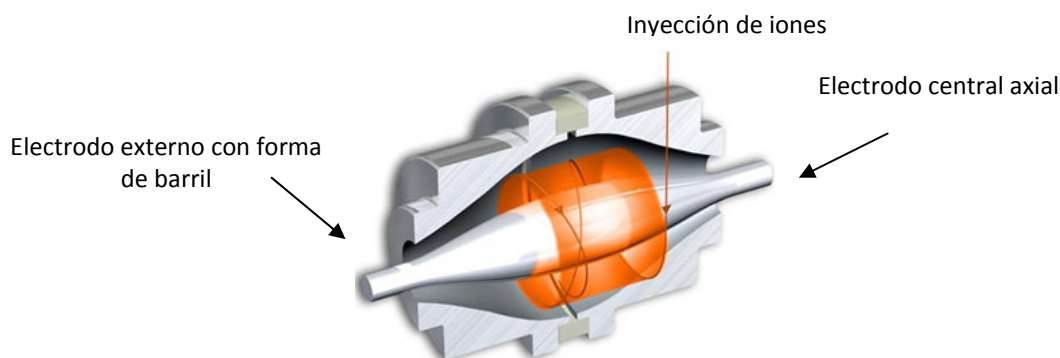


Figura 20. Esquema de un Orbitrap

En la Tabla 2 se resumen las características comparadas de los principales analizadores para espectrometría de masas molecular.

Tabla 2. Características analíticas de los analizadores de masas empleados en MS.

Instrumento	Resolución (m/ Δ m)	Exactitud (ppm)	Sensibilidad	Rango m/z	Velocidad	Rango dinámico	Coste
Q	1000	100-1000	fmol	10-4000	Moderada	10^7	€
TOF	10000-20000	10-20	fmol	sin límite superior	Rápida	10^4	€€-€€€
QIT	1000-10000	100-1000	pmol	50-2000/ 200-4000	Moderada	10^3	€
LITQ	2000-10000	100-500	fmol	50-2000/ 200-4000	Rápida	10^4	€€
FT ICR	50000-1000000	< 2	fmol	50-2000/ 200-4000	Lenta	10^3	€€€€€
Orbitrap	30000-100000	< 5	fmol	50-2000/ 200-4000	Moderada- rápida	$4 \cdot 10^3$	€€€€

2.4.1.4. Instrumentos para espectrometría de masas en tándem

El empleo de ESI o MALDI permite producir iones moleculares, lo cual proporciona información referente al peso molecular de las especies, pero no proporciona datos estructurales. La fragmentación de los iones producidos y el análisis de las m/z asociadas a los fragmentos cargados que se generen permiten llegar a esa información estructural, dado que la fragmentación de biomoléculas está regida por determinadas reglas, en función de la labilidad de los enlaces.

Los instrumentos de espectrometría de masas en tándem para obtener información estructural se clasifican en dos categorías: los que realizan experimentos MS/MS en el espacio y los que lo realizan en el tiempo.

Los *instrumentos tándem en el espacio* realizan los tres pasos de MS/MS (selección de iones de cierta m/z , fragmentación y análisis de las masas de los fragmentos) en tres regiones independientes. Normalmente, esto se consigue colocando en serie dos analizadores de masas (MS1 y MS2), separados por una celda de colisión en la que se induce el proceso de disociación. Ejemplos de estas configuraciones híbridas son el triple cuadrupolo (QqQ) o instrumentos basados en analizadores TOF (Q-TOF, TOF-TOF).

Los *instrumentos tándem en el tiempo* realizan los distintos pasos de aislamiento, fragmentación y análisis en la misma cavidad pero siguiendo una secuencia temporal. El experimento se realiza, por tanto, en un solo analizador que es del tipo de trampa de iones (QIT, LTQ, FT-ICR). Este tipo de analizadores presentan la ventaja de que permiten el aislamiento de uno de los fragmentos generados en el espectro MS^2 , pudiéndose repetir el proceso de fragmentación, hasta n veces, dando lugar a un espectro MS^n .

Los distintos tipos de fragmentos más comúnmente generados en el caso de los péptidos/proteínas se muestran en la Figura 21. En función del método de fragmentación se producirán ciertos tipos de fragmentos preferentemente, que permitirán deducir cual es la secuencia de la proteína/péptido fragmentado.

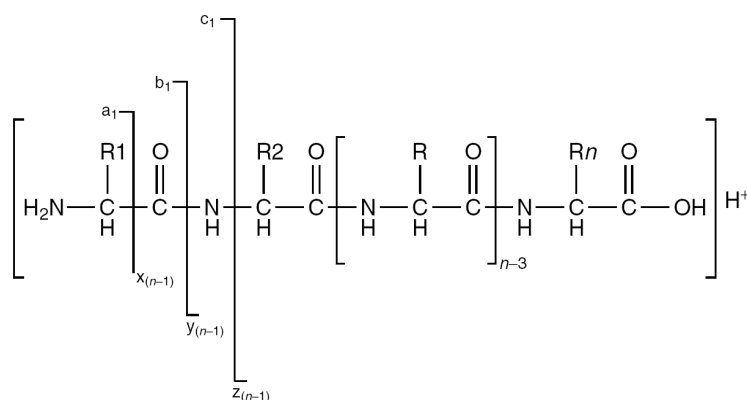


Figura 21. Nomenclatura de los iones más comúnmente formados en MS/MS durante la fragmentación de polipéptidos. Las líneas verticales indican los enlaces químicos que se rompen. Cuando la carga queda en fragmentos que retienen el extremo N-terminal, los iones producidos se denominan a, b, c, según el enlace escindido. La numeración de estas series comienza por el aminoácido N-terminal. Cuando la carga se localiza en el extremo C-terminal los iones producidos se designan como x, y, z. En este caso, la numeración de las series comienza por el aminoácido C-terminal.

2.4.1.5. Métodos de fragmentación de biomoléculas

Para el análisis de biomoléculas como proteínas y péptidos, la fragmentación puede efectuarse mediante diversos métodos: CID (disociación inducida por colisión), ECD (disociación por captura de electrones) y ETD (disociación por transferencia de electrones).

CID

CID es el método de fragmentación más comúnmente empleado para la espectrometría de masas en tándem. Consta de dos etapas: activación por colisión y disociación unimolecular. Durante un primer paso de activación por colisión, el ión precursor seleccionado se excita hasta un estado de alta energía, mediante colisión con átomos de un gas inerte, como He o Ar. Durante el proceso de excitación, parte de la energía translacional del ión precursor se transforma en energía interna, que desencadena su fragmentación.

El modelo que explica la fragmentación de los péptidos por CID de baja energía es el del protón móvil,²⁵⁵ que supone que la fragmentación está dirigida por la carga, produciendo principalmente la ruptura en los enlaces peptídicos, y dando lugar a los iones de tipo y-, b-. Sin embargo, en un espectro de fragmentación por CID también pueden aparecer adicionalmente: pérdidas de moléculas neutras (H₂O, NH₃), fragmentos internos por ruptura en dos puntos, iones imonio, y otro tipo de fragmentos.

ECD

ECD fue introducido por McLafferty en 1998.²⁵⁶ En un experimento ECD los iones precursores de carga múltiple atrapados en una célula ICR reaccionan con electrones térmicos producidos en la célula con un generador de electrones. La captura de un electrón por parte de un péptido de carga múltiple es un proceso exotérmico y da lugar a la fragmentación de la cadena peptídica. Se observan dos fenómenos: reducción del estado de carga del ion precursor inicial y la ruptura de la cadena dando lugar a iones de tipo c y z, principalmente, debidos a la ruptura en el enlace N-C α . Además, también se producen algunos fragmentos de tipo b/y. A diferencia de los espectros CID, en los que la intensidad de los distintos fragmentos es diversa, en ECD se generan fragmentos de intensidad de señal similar. Este tipo de fragmentación preserva las modificaciones químicas lábiles que pueda haber en el péptido analizado y que suelen perderse con CID, dado que las rupturas de la cadena ocurren de una manera independiente en ECD. De esta manera, es útil para la caracterización de modificaciones postransduccionales (PTMs), como

fosforilación, o-glicosilación, acilación, etc. Esta técnica es sólo aplicable en instrumentos FT-ICR donde los electrones térmicos puedan tener suficiente tiempo de residencia.

ETD

ETD permite realizar el tipo de reacción descrita para ECD en otras trampas de iones. Esta técnica fue desarrollada por Syka y *col.* en 2004.²⁵⁷ En este caso, los electrones de baja energía se transfieren al ion precursor en fase gaseosa y para ello se utilizan especies dadoras de electrones, como aniones de antraceno o fluorantreno que se producen fuera de la trampa de iones. De forma similar a ECD, este proceso da lugar a iones fragmento de tipo c, z, de similar intensidad y también permite conservar PTMs lábiles, por lo que tiene gran interés en análisis en proteómica.²⁵⁸ ETD proporciona una mayor cobertura de la secuencia de péptidos pequeños y medianos y es complementario al empleo de CID para la identificación de proteínas.²⁵⁹ También tiene gran interés para la fragmentación de proteínas íntegras.²⁶⁰

2.4.1.6. Reconocimiento de especies modificadas con Pt por MS: el perfil isotópico

Para detectar la presencia de una modificación en una biomolécula como una proteína/péptido es posible tener en cuenta las diferencias de masas obtenidas entre fragmentos sucesivos en experimentos MS/MS. Sin embargo una herramienta adicional muy útil para la identificación de especies que contienen metales es el reconocimiento de su perfil isotópico característico. La mayoría de los elementos presentan distintos isótopos estables, lo que añade cierta complejidad al espectro pero puede asistir en la determinación de la fórmula química y el estado de carga de los iones. En el caso de las proteínas, están constituidas por C, H, O, N, S y P, cuyos isótopos y abundancias condicionan el perfil isotópico que presentan. El isótopo de ¹³C (1,1 % de abundancia natural) es el determinante en el perfil isotópico resultante. De esta forma, cuanto mayor sea el número de átomos de carbono, y por tanto, más grande sea una proteína, más complejo será el perfil y más se alejará de la presencia de un pico monoisotópico predominante.

La existencia en una molécula de un metal que presente en la naturaleza varios isótopos abundantes, modificará sensiblemente el perfil isotópico observado. Además esta variación será más acusada cuanto más pequeña sea la molécula original, dado que tendrá mayor contribución al perfil resultante el heteroátomo o metal en cuestión. Por lo tanto, será una característica apreciable en especies como péptidos o proteínas pequeñas, siendo el perfil dependiente de la

composición y, por tanto, de la masa resultante. El platino presenta una distribución isotópica tal que tres isótopos (^{194}Pt , ^{195}Pt y ^{196}Pt) tienen una abundancia similar (Tabla 3). De esta forma, ciertos perfiles isotópicos característicos al analizar péptidos o proteínas pequeñas podrán servir como indicativo de la presencia de platino (Figura 22). Además, dependerá de la resolución que ofrezca el espectrómetro de masas empleado que los perfiles isotópicos puedan ser resueltos y reconocidos y por tanto, pueda llegar a distinguirse la presencia de platino en un péptido.

Tabla 3. Masa nominal, masa exacta y abundancia relativa para los isótopos del Pt existentes en la naturaleza.

Elemento	Masa nominal	Masa exacta, u	Abundancia relativa (%)
Pt	190	189,959937	0,01
	192	191,961049	0,79
	194	193,962679	32,9
	195	194,964785	33,8
	196	195,964947	25,3
	198	197,967879	7,2

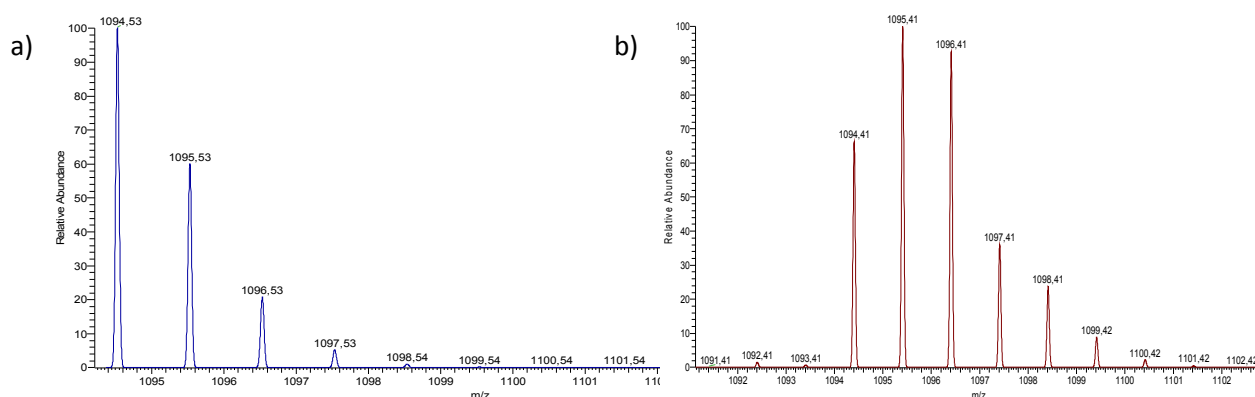


Figura 22. Perfiles isotópicos para un péptido de masa 1094 a) con composición normal y b) modificado con Pt.

2.4.1.7. Aplicaciones de MALDI-MS y ESI-MS para el análisis directo de metalobiomoléculas

La aplicación directa de técnicas de espectrometría de masas para estudios de metalómica en principio sería factible siempre que se trate de una muestra sencilla, bien un extracto de una muestra biológica o una disolución como la resultante de la incubación *in vitro* de metalodrogas con proteínas, péptidos o nucleótidos sintéticos u otras biomoléculas patrón; o bien metaloproteínas patrón. En el caso de matrices complejas, se producirían problemas asociados a la ionización competitiva de los analitos. Por este motivo, en dichos casos será necesaria la separación previa de los compuestos, como se verá en la sección 2.4.2. Otra precaución a tener en cuenta al emplear estas técnicas es la necesidad de trabajar con muestras carentes de sales, ya que éstas pueden producir la supresión de la ionización de los analitos. Frecuentemente las incubaciones de metalodrogas con biomoléculas se preparan en medios acuosos que simulan las condiciones fisiológicas de sistemas biológicos, es decir con disoluciones reguladoras basadas en el uso de 10-50 mM Tris, HEPES, con pH 7.0-7.4, incluyendo NaCl, NaHCO₃ como electrolitos. De forma general, las muestras han de ser desaladas previamente a su análisis, mediante el uso de filtros de corte molecular, cartuchos de fase inversa, de exclusión molecular, diálisis, etc., como se recoge en la sección 2.5. Además, han de ser preparadas para su introducción en disolventes adecuados para cada método de ionización en MS.

En cuanto al análisis de complejos metal-biomoléculas, en general, MALDI es algo menos apropiado que ESI en cuanto a la conservación del enlace metal-biomoléculas, que puede verse afectado durante el proceso de ionización. Este hecho parece ser muy dependiente del tipo de matriz escogida para MALDI y de su forma de preparación, pero también dependerá de la naturaleza del complejo metálico. Así, en el caso de los análisis por MALDI-TOF realizados sobre superóxido dismutasa (SOD)²⁶¹ tanto en patrones como en muestras de sangre humana, pudieron observarse picos correspondientes a complejos de la proteína con 1 Cu y 1 Zn, sólo con 1 Cu o 1 Zn, y la proteína libre cuando se empleó 2,4,6-trihidroxiacetofenona como matriz; mientras que con CHCA sólo se observó un pico de apoproteína, habiendo perdido los metales originalmente coordinados. Sin embargo, durante el análisis de diversos complejos de coordinación no bioinorgánicos de Pt (II) y Pd (II), resultó ser mejor matriz DHB para el Pt(II), mientras que CHCA era preferible para el Pd(II),²⁶² poniendo de manifiesto la dependencia en la naturaleza del complejo metálico. Además se comprobó la tendencia a la pérdida de los ligandos asociados a los metales durante MALDI. Este hecho también se percibió durante el estudio de la incubación de ubiquitina con complejos de platino, donde se observaron complejos platinados

tanto empleando ácido sinapínico como CHCA, pero con cierta tendencia a la pérdida de los ligandos NH_3 y Cl coordinados al metal. Por otro lado se producía un mayor grado de fragmentación del enlace metal-proteína en comparación con análisis paralelos con ESI-Q-TOF, con el que se detectaron aductos platinados de ubiquitina con hasta tres átomos de Pt, siendo observables numerosos tipos de restos metalados, destacando $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ o $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$, en función del tiempo de incubación.⁷¹

Por otra parte, el uso de MALDI-TOF, empleando DHB como matriz, permitió estudiar la formación de complejos durante la incubación de MTs tanto con cisplatino como con complejos de rutenio.²⁶³ Cabe destacar, además, que esta técnica sirvió para evaluar la formación de complejos tras la incubación de TrxR y compuestos de Au(I) y Au (III), tanto a nivel de proteína íntegra (usando ácido sinapínico como matriz) como tras su digestión triptica, observando péptidos con Au, con una matriz de CHCA.²⁶⁴ Asimismo, se estudió la formación de complejos de HSA con el fármaco de Ru RAPTA²⁶⁵ y sirvió para el análisis de péptidos marcados con un grupo DOTA unido a metales.²⁶⁶ Por lo tanto, optimizando la matriz a utilizar y las condiciones de análisis, MALDI-MS puede ser una alternativa sencilla y a tomar en consideración para el estudio de complejos metálicos. En la Tabla 4 se recogen los trabajos mencionados sobre el empleo de MALDI para el análisis de metalocompuestos.

Tabla 4. Selección de aplicaciones de MALDI-MS para la caracterización directa de metalocompuestos.

Metales (origen)	Molécula	Técnica	Matriz (MALDI)	Referencia
Cu (II), Zn (II) (endógenos)	SOD	MALDI-TOF	2,4,6-trihidroxiacetofenona/ CHCA	261
Pt (II), Pd (II) (complejos inorgánicos)	$[\text{PtCl}_2(\text{en})]$, $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ $[\text{PdCl}(\text{dien})]\text{Cl}$	MALDI-TOF	DHB/ CHCA	262
Pt (II) (cisplatino, transPt, oxaliPt)	Ubiquitina	MALDI-TOF/ ESI-Q-TOF	Ácido sinapínico/CHCA	71
Pt (II), Ru (II) (cisPt, complejos arenos de Ru)	MT	MALDI-TOF	DHB	263
Au (III)/ Au (I) (compuestos antiartríticos)	TrxR/péptidos trípticos TrxR	MALDI-TOF	Ácido sinapínico /CHCA	264
Ru (II) (RAPTA)	HSA	MALDI-TOF-TOF	Ácido sinapínico	265
Tb, Tm, Ho, Lu (DOTA)	Péptidos	MALDI-TOF	CHCA	266

ESI-MS, en comparación con MALDI-MS, es una técnica más adecuada para la caracterización de metalobiomoléculas dado su mayor carácter de ionización suave, provocando un inferior grado de fragmentación en los complejos con metales y una mayor conservación de los ligandos externos asociados al metal, y por tanto de las especies originales.²⁶⁷ Existen numerosas aplicaciones de esta técnica para el estudio de proteínas que forman complejos con fármacos de platino tras su incubación *in vitro*. Además del posible reconocimiento de complejos metálicos, en base a su masa y perfil isotópico, realizando experimentos ESI-MS/MS (generalmente por CID) es posible identificar los complejos formados y caracterizarlos estructuralmente en cuanto a la posición o región de la proteína (o biomolécula) a la que se encuentra coordinado el elemento metálico. Dada la complejidad en la fragmentación de las proteínas íntegras, a menudo se acude a su digestión previa con un agente proteolítico que permita la producción de péptidos, que después pueden ser analizados y fragmentados con facilidad (como se detalla en la sección 2.6.1.). Mediante el uso de ESI-LTQ-MS, se estudió la formación de complejos entre CYT C y cisplatino, transplatino, carboplatino u oxaliplatino.⁸⁰ Posteriormente, realizando experimentos de fragmentación con LTQ-FT-ICR MSⁿ sobre péptidos con platino, producidos a partir de la digestión de complejos CYT C-cisplatino, se dedujo su punto de coordinación fundamental, Met 65.⁸¹ De forma análoga esta última estrategia se aplicó a digeridos de complejos formados entre mioglobina y cisplatino, obteniéndose His 116 e His 119 como puntos de coordinación de Pt.⁸²

Empleando nESI-Q-TOF, se estudió también desde el punto de vista estequiométrico y cinético la reacción entre MTs y diferentes complejos *cis* y *trans* de Pt(II).⁶⁷ Por otro lado, se ha evaluado la reacción de cisplatino con la chaperona Cop C, demostrando que se coordina el Pt a la región rica en metioninas en presencia de otra región rica en histidinas, mediante ESI-FT-ICR.²² Asimismo, se estudió la interacción de un péptido conteniendo la región N-terminal abundante en residuos His y Met de Ctr1, con diversos fármacos de platino, combinando el uso de ESI-QIT MS, RMN y dicroísmo circular, y concluyendo la unión del Pt a residuos Met 1, 7, 9, 12, perdiendo el cisplatino todos sus ligandos originales.⁵¹ Recientemente también se abordó la determinación de puntos de coordinación de cisplatino en ubiquitina, tras su incubación y su posterior digestión triptica, generando péptidos que se analizaron mediante ESI-FT-ICR-MSⁿ.⁷³ Además, mediante ESI-QIT-MS/MS se estudió la reactividad de los complejos [*cis*-Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ [*cis*-Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ con los péptidos sulfurados MRFA/GSH/Ac-MAS y su evolución temporal, permitiendo proponer la estructura de los complejos formados.²⁶⁸

En cuanto a la fragmentación directa de aductos Pt-proteína, existen algunos ejemplos, como una primera aplicación para caracterizar complejos entre oxaliplatino y hemoglobina en

muestras de pacientes con cáncer recibiendo tratamiento antitumoral, aplicando nESI-Q-TOF MS/MS.²⁶⁹ También permitió el estudio de la interacción de MTs con cisplatino, en el que se efectuó la fragmentación de un complejo mediante nESI-Q-TOF MS/MS, lo que permitió observar la coordinación de Pt a Cys 5 y Cys 7.²⁷⁰ Posteriormente, Hartinger y col. determinaron Met 1 como sitio de unión de cisplatino y oxaliplatino en Ub, empleando ESI-FT-ICR-MS/MS, empleando CID como método de fragmentación. Además evaluaron ECD como método alternativo, no observándose fragmentos platinados con dicha estrategia.⁷⁰ No obstante, recientemente, Li y col. obtuvieron información estructural combinando CID y ECD en calmodulina incubada con diversos complejos de platino, analizada directamente mediante ESI-FT-ICR-MS/MS, pudiendo determinar entrecruzamientos en la proteína como consecuencia de la coordinación simultánea de Pt a diferentes Met en la estructura proteica, con la consecuente pérdida de todos los ligandos asociados al complejo inicial de Pt.^{83, 84} Además, se han caracterizado otros metalocompuestos como complejos de Ru, por ejemplo por incubación de RAPTA T con Ub, citocromo C y SOD, empleando ESI-LTQ-Orbitrap MS.²⁷¹ Por otro lado, el uso de ESI-QIT-MS/MS permitió estudiar la formación de aductos de cisplatino con los nucleótidos d(ApG), d(GpG) y d(TpC).²⁷²

En la Tabla 5 se recogen los trabajos mencionados sobre el empleo de ESI-MS para el análisis directo de complejos Pt-proteínas generados en incubaciones de compuestos de Pt con proteínas/péptidos patrón.

Tabla 5. Selección de aplicaciones de ESI-MS para la caracterización directa de Pt-biomoléculas generados en incubaciones *in vitro* de compuestos de Pt con proteínas o péptidos.

Complejo metálico	Biomolécula	Técnica (muestra)	MS/MS (activación)	Información obtenida	Referencia
Cisplatino, transplatino, oxaliplatino	Ub	ESI-Q-TOF/ MALDI-TOF (aductos)	No	Aductos formados, estequiometría	71
Cisplatino, transplatino, carboplatino, oxaliplatino	CYT C	ESI-LTQ (aductos)	No	Aductos formados y estequiometría	80
Cisplatino	CYT C	ESI-LTQ-FT-ICR (aductos y digerido triptico)	Sí, sobre digerido triptico (CID)	Aductos: estequiometría y cinética. Puntos de coordinación: Met 65	81
Cisplatino/ transplatino	MYO	ESI-LTQ-FT-ICR (aductos y digerido triptico)	Sí, sobre digerido triptico (CID)	Aductos: estequiometría y cinética. Puntos de coordinación: His 116/ His119	82
Varios complejos Pt(II) cis y trans	MT	nESI-Q-TOF (aductos)	No	Aductos: Estequiometría y cinética	67
Cisplatino	Cop C	ESI-FT-ICR (digerido triptico)	No	Formación de aductos. Coordinación en zona rica en Met.	22
Cisplatino, transplatino, carboplatino, oxaliplatino	Péptido: CTR1-N20	ESI-QIT, RMN, CD (complejos peptídicos)	Sí, sobre el aducto con cisplatino (CID)	Formación de aductos, estequiometría y cinética. Coordinación a Met 1, 7, 9, 12	51
cis- [Pt(NH₃)₂(H₂O)₂] 2+ cis- Pt(en)(H₂O)₂]²⁺	Péptidos: MRFA/GSH/ AcMAS	ESI-QIT (aductos peptídicos)	Sí, sobre los Pt-péptidos (CID)	Formación de aductos, evolución temporal. Propuesta estructural de los aductos.	268
Cisplatino	Ub	ESI-LTQ-FT-ICR / ESI-QIT (aductos y digerido triptico)	Sí, sobre el digerido triptico (CID)	Estequiometría y cinética. Puntos de coordinación (Met1, Thr12, Thr 14, Asp 32)	73
Oxaliplatino	Hb (patrón y muestra clínica)	nESI-Q-TOF	Sí, directa sobre aductos (CID)	Aductos formados. Unión de Pt a cadenas α y β	269
Cisplatino	MT	nESI-Q-TOF	Sí, directa sobre aductos (CID)	Coordinación de Pt a Cys 5 y Cys 7	270
Cisplatino, transplatino, oxaliplatino	Ub	ESI-FT-ICR	Sí, directa sobre aductos (CID, ECD)	Coordinación a Met 1 (cis/oxaliplatino) o a zona 19-24 (transplatino)	70
Cisplatino, varios complejos de Pt (II)	CaM	ESI-FT-ICR	Sí, directa sobre aductos y digeridos tripticos (CID, ECD)	Aductos generados. Puntos de coordinación de Pt (Met, His, Asp, Glu)	83, 84

2.4.2. Técnicas acopladas de análisis en especiación

Como se introdujo anteriormente en la sección 2.4., la combinación de técnicas de separación y de detección y elucidación estructural será crucial para el análisis metalómico de muestras biológicas complejas. Mediante la aplicación de técnicas de separación se conseguirá teóricamente solventar el problema de selectividad que tiene lugar cuando coexisten dos especies conteniendo el mismo elemento, a la hora de la detección con ICP-MS; o la ionización competitiva de varias especies cuando se emplee la espectrometría de masas molecular para la determinación estructural. Sin embargo, un aspecto que se habrá de tener en consideración es la posible transformación de especies y la alteración del enlace metal-biomoléculas durante los tratamientos de muestra involucrados.

Tal y como se reflejaba en la Figura 14, como técnicas separativas, puede emplearse la cromatografía de líquidos (HPLC), siendo las modalidades más utilizadas SEC (cromatografía de exclusión por tamaños), IE (cromatografía de intercambio iónico), RP (cromatografía de fase inversa) y HILIC (cromatografía de interacción hidrofílica). También es posible el uso de técnicas electroforéticas para la separación de aductos metal-biomolécula, como la electroforesis monodimensional en gel, en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) o el isoelectroenfoque (IEF), o bien la técnica bidimensional 2-DE, que emplea ortogonalmente IEF y SDS-PAGE. Por otra parte, la electroforesis capilar también se ha utilizado en numerosas ocasiones para estudios de metalómica. Todas las técnicas de separación antes comentadas pueden acoplarse a ICP-MS, ya sea “*on-line*”, en el caso de LC o CE, u “*off-line*”, para SDS-PAGE, empleando una célula de ablación láser (LA-ICP-MS). El uso de un detector elemental de alta sensibilidad y selectividad, como el ICP-MS, permite monitorizar el metal en estudio, tras el proceso de separación de sus especies, e incluso su cuantificación.

En cuanto a las técnicas de elucidación estructural, pueden resultar aplicables técnicas de espectrometría de masas molecular utilizando MALDI y ESI. Sin embargo, en determinados casos podrían ser informativas las técnicas clásicas de RMN o difracción de rayos X. Sin embargo, el acoplamiento LC-MS o CE-MS empleando ESI como interfase está muy desarrollado y MS proporciona información más extensa y fácil de interpretar, por lo que ésta suele ser la técnica de elucidación estructural de elección inmediata para caracterizar metalobiocompuestos. El uso de MALDI-MS es menos frecuente debido a que, además de su ya mencionada inferior capacidad de conservación del enlace metal-biomolécula, ha de ser aplicado “*off-line*” tras la técnica de separación. No obstante, la sensibilidad y especificidad de ICP-MS, además de su capacidad cuantitativa, inigualables por ESI-MS o MALDI-MS, hace que el uso de

la primera nunca pueda ser totalmente sustituido por las últimas para un estudio completo en metalómica, que puede beneficiarse de la combinación de ambos. Dada la importancia de este hecho, recientemente se ha desarrollado un espectrómetro de masas con analizador TOF con una fuente dual ICP y ESI, permitiendo el acoplamiento simultáneo a ambos tipos de ionización, y por tanto, la obtención de la información elemental y molecular en un mismo análisis.²⁷³ A continuación se detallan las técnicas acopladas más comúnmente empleadas en metalómica, clasificadas en función de la técnica de separación aplicada.

2.4.2.1. HPLC

En un elevado número de estudios, se ha acudido al acoplamiento SEC-ICP-MS para realizar un rápido “*screening*” cualitativo de metalobiomoléculas en muestras biológicas. El acoplamiento es muy sencillo y permite el fraccionamiento en condiciones nativas de metalobiomoléculas en función de su tamaño, seguido de la detección multielemental, lo que permite monitorizar tanto diversos metales como otros heteroátomos que puedan estar presentes, como P (en el caso de fosfoproteínas, o nucleótidos) o S en las proteínas. Mediante su uso se estudiaron perfiles multielementales en muestras de leche,²⁷⁴ tejidos de tiroides sano y tumoral,²⁷⁵ en pescado,²⁷⁶ citosoles de cerebro con Alzheimer, para la especiación de Cd y Zn en metalotioneínas,²⁷⁷ o para el estudio de las especies metálicas en muestras de hígado o cerebro de ratón, en condiciones de contaminación ambiental.²⁷⁸ SEC-ICP-MS también se empleó para estudiar los productos de hidrólisis de cisplatino, la formación de complejos con GSH o MT, que se identificaron posteriormente mediante ESI-LTQ-MS/MS,¹²⁸ o para obtener perfiles de Pt en citosoles de riñón u oído de ratas tratadas con cisplatino.²⁷⁹ En otro estudio reciente se empleó SEC-ICP-MS para la separación de complejos de W en suero de ratas diabéticas tratadas con Na₂WO₄. Además mediante MALDI-TOF se efectuó la identificación de un complejo HSA-WO₄ en una fracción cromatográfica recogida en la que se detectó W.²⁸⁰ También la conjunción SEC-ICP-MS y ESI-MS sirvió para el estudio de la unión de cisplatino o un compuesto de Ru, RAPTA T, a las proteínas de suero sanguíneo HSA y TF²⁸¹ y los complejos formados al incubar cisplatino con Hb.²⁸²

Sin embargo, SEC tan sólo puede considerarse una técnica semipreparativa, ya que su resolución es baja y la pureza de los picos cromatográficos es reducida, aunque permite el análisis de muestras relativamente concentradas. Por otro lado es necesario controlar la recuperación de las especies de la columna para evitar que posibles iones metálicos retenidos en la fase estacionaria puedan intercambiarse con los de otros complejos metálicos o que sean complejados por otros bioligandos. No obstante, en muchos casos puede ser muy útil como

método de fraccionamiento inicial previo a otras dimensiones separativas. Tal es el caso del intercambio aniónico (AE), que permite la separación de especies aniónicas y que presenta mayor poder de resolución que SEC y capacidades preconcentradoras. De hecho, se empleó AE como segunda dimensión en estudios de complejos metálicos de Zn, Cd o Cu con MTs en organismos como mejillón, carpa o anguilas.²⁵² También se ha aplicado en combinación con SEC, acoplado a ICP-MS para la separación de complejos de Ni en tejidos de pacientes con cáncer²⁸³ o para la especiación de platino en citosoles de ratas tratadas con cisplatino.²⁷⁹ La incompatibilidad de las disoluciones empleadas en SEC o AE con ESI-MS hace que no sea posible su acoplamiento en línea, al contrario que en el caso de ICP-MS, que puede ser compatible siempre y cuando se empleen concentraciones salinas reducidas (ya que el empleo de sales puede provocar problemas de obturación de los conos y del nebulizador y un descenso de la señal) o sales volátiles.

Por otro lado, RP efectúa la separación en función de la hidrofobicidad de las moléculas, empleando fases estacionarias de sílice con cadenas carbonadas de longitud variable (C₄-C₁₈) o poliméricas. Generalmente se emplea con gran efectividad para la separación de péptidos (tras la digestión de proteínas), dada su gran resolución (especialmente trabajando en modo de elución en gradiente) y su capacidad preconcentradora. En el caso de proteínas, la gran extensión de sus interacciones con este tipo de fase estacionaria hace que sea más problemática su recuperación, y por tanto su aplicación. Sin embargo, ciertas proteínas pequeñas pueden ser adecuadas para este tipo de separación, como es el caso de complejos metálicos con MTs en hígado y riñón de rata, que se analizaron por RP-ICP-MS.²⁸⁴

Por otra parte, HILIC presenta particular interés para el estudio de metalometabolitos por el carácter polar y la baja hidrofobicidad de estos. Las fases estacionarias están constituidas por grupos polares o hidrofílicos y las fases móviles utilizadas incluyen medios acuosos y orgánicos. Mediante el uso de HILIC se abordó el análisis del selenometaboloma en levadura²⁸⁵ o de complejos metálicos con moléculas orgánicas como fitosideróforos divalentes o ácidos orgánicos.²⁸⁶

El empleo de fases móviles orgánicas en RP o HILIC provoca una disminución en la señal al ser introducidas en ICP-MS y una inestabilidad en el plasma. Por tanto, para su acoplamiento a ICP-MS es necesario el empleo de una cámara de nebulización enfriada o un desolvatador de membrana, para minimizar la llegada de vapor de disolvente al plasma. Además se suele adicionar oxígeno al gas del plasma para producir la combustión de los disolventes orgánicos, y evitar los depósitos de carbón, y se utilizan conos de platino, ya que los habituales de Ni se ven rápidamente atacados. Sin embargo, la reducción de los caudales de fase móvil,

empleando capHPLC (por ejemplo, $4 \mu\text{L min}^{-1}$) o nanoHPLC (por ejemplo, 200 nL min^{-1}) elimina los problemas relacionados con la introducción de disolventes orgánicos en ICP-MS, pudiendo trabajar con 100% de fase orgánica sin necesidad de emplear una cámara de nebulización refrigerada o adición de O_2 . En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el acoplamiento de estos sistemas a ICP-MS, habiéndose desarrollado micro-²⁸⁷ y nano-nebulizadores^{288, 289} con cámaras de vaporización de “consumo total” que no requieren de la adición de flujo auxiliar alguno.

Por otro lado, a diferencia de las otras modalidades de HPLC, el tipo de fases móviles empleadas en RP o HILIC (disolventes orgánicos como acetonitrilo o metanol y fases acuosas con tampones volátiles) hacen estas técnicas muy compatibles para su acoplamiento a ESI-MS, y tanto capHPLC como nanoHPLC pueden acoplarse de forma sencilla al anterior con interfases comerciales. Por ejemplo, en el caso de nanoHPLC, basta con conectar a la salida de la columna un capilar metálico, al que se aplicará una diferencia de potencial. En consecuencia, las convierten en técnicas de elección para efectuar el acoplamiento en paralelo HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS para completar multitud de estudios de metalómica, generalmente como dimensión separativa final tras previas separaciones de las metaloespecies.²⁹⁰⁻²⁹⁴ De esta forma, conociendo los tiempos de retención para las especies metálicas, determinados por HPLC-ICP-MS se facilita el hallazgo de metaloespecies por HPLC-ESI-MS/MS, también en base a su perfil isotópico. Además, la posibilidad de realizar sencillas y rápidas preconcentraciones en línea empleando una precolumna de RP donde se retengan los analitos, seguido de elución contracorriente hacia la nanocolumna cromatográfica donde tiene lugar la separación, supone un aumento de la sensibilidad y prestaciones de la técnica. En la Figura 23 se muestra el montaje habitual descrito para el análisis de péptidos por nanoHPLC acoplado a ICP-MS y ESI-MS/MS, como en el estudio de selenopéptidos.²⁹³

Puede destacarse el estudio de la interacción de cisplatino con las proteínas de un suero sanguíneo mediante AE-ICP-MS, y ESI-Q-TOF, lo que permitió determinar el tipo de complejos de Pt formados con HSA y TF. Además, se analizaron los digeridos tripticos de HSA y TF en paralelo mediante capHPLC(RP)-ICP-MS y capHPLC(RP)-ESI-Q-TOF MS.²⁹ Por otro lado, el empleo del acoplamiento capHPLC(RP)-ESI-Q-TOF-MS/MS permitió el análisis de los péptidos resultantes de la digestión de complejos de albúmina humana recombinante con cisplatino, pudiendo establecerse los entrecruzamientos producidos por coordinación simultánea de $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ entre His 67 e His 247; así como la posible coordinación de Pt a otros puntos como Cys 124 (normalmente involucrado en la formación de puentes disulfuro), His 128 y Met 298.²⁷ García Sar y col. también emplearon la combinación de HPLC-ICP-MS y ESI-Q-TOF para

cuantificar por dilución isotópica e identificar aductos de ADN con cisplatino en *Drosophila Melanogaster* y en células tumorales.²⁹⁵

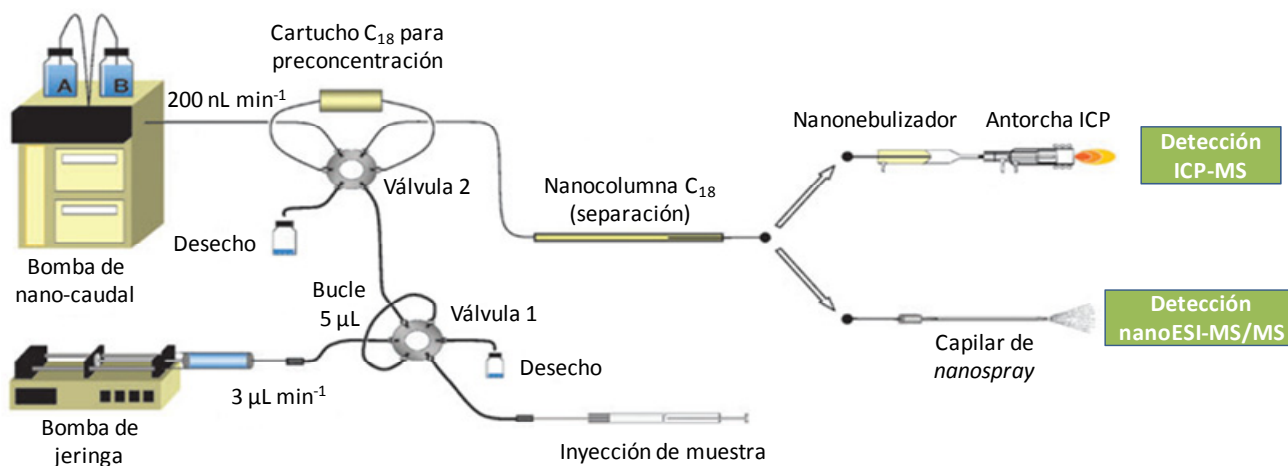


Figura 23. Estrategias para el análisis de metalopéptidos mediante nHPLC acoplado a ICP-MS y ESI-MS/MS. Adaptado de Monicou y col.²⁹⁶

2.4.2.2. CE

La electroforesis capilar (CE. En su forma más sencilla, electroforesis capilar de zona, CZE) plantea la separación de compuestos, atendiendo a su diferente movilidad dependiendo de su m/z , pudiendo producir la separación de compuestos cargados y neutros. Dadas sus características analíticas: alta resolución, baja cantidad de muestra necesaria (entre 5 y 50 nL), cortos tiempos de análisis y ausencia de una fase estacionaria, el empleo de composiciones electrolíticas compatibles con condiciones fisiológicas de incubación o matrices biológicas; CE ofrece grandes ventajas para los análisis de especiación en muestras biológicas y ayuda a preservar las metaloespecies.²⁹⁷ Además el acoplamiento CE-ICP-MS es de aplicación sencilla al existir interfases comerciales.²⁹⁸ Estas interfases emplean un micronebulizador de consumo total, una cámara de nebulización de bajo volumen muerto y el cierre del circuito eléctrico en la interfase, insertando un electrodo en un flujo auxiliar, y evitando que aparezca un flujo laminar. Por otro lado, en ocasiones el uso de disoluciones salinas en los acoplamientos CE-ICP-MS pudiera producir problemas de obstrucción del nebulizador. Una forma de solventarlo es emplear la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), que además podría ser de utilidad para el análisis de compuestos neutros.²⁹⁹ En estudios metalómicos, CE-ICP-MS ha sido empleado para la determinación de constantes cinéticas y de equilibrio en la reacción de metalodrogas²⁹⁹ con proteínas, en plasma y suero humano y en sus reacciones de hidrólisis.³⁰⁰⁻³⁰² Además ha permitido el estudio de la estequiometría de complejos metal-proteínas.³⁰³ Asimismo, ha servido

como dimensión adicional en la separación de fracciones conteniendo metales, aisladas por cromatografía.³⁰⁴ También se ha empleado en estudios de especiación de Cu, Zn y Cd en MT.³⁰⁵,³⁰⁶ y se ha utilizado para estudiar la reacción de cisplatino con HSA.³⁰⁷

Aunque el acoplamiento CE-ESI-MS es posible para análisis estructural, actualmente aún presenta insuficiente sensibilidad y plantea serias dificultades. Tanto el desarrollo de métodos de preconcentración en línea como el empleo de una interfase para *nanospray* son retos que han de afrontarse para explotar las ventajas del potencial uso combinado de CE-ICP-MS y CE-ESI-MS. No obstante, el uso de CE-ESI-MS permitió estudiar la formación de aductos con nucleótidos modelo como dGMP con cisplatino³⁰⁸ y la determinación de fitoquelatinas en extractos de células de soja y de raíz de arroz.³⁰⁹

2.4.2.3. Electroforesis en gel (PAGE, IEF, 2-DE)

Dada la gran complejidad de las muestras biológicas proteicas, y la baja abundancia de las metaloproteínas, es necesario acudir a técnicas de alta resolución para su separación. La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es la técnica más adecuada para este fin a escala micropreparativa, presentando una alta resolución separativa. Fundamentalmente puede emplearse PAGE en condiciones desnaturalizantes, empleando dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE); individualmente, o en combinación con la técnica de isoelectroenfoque (IEF), dando lugar a la llamada electroforesis bidimensional 2-DE, que permite la separación de miles de proteínas en un solo gel.

SDS-PAGE es capaz de separar las proteínas en función de su tamaño, generalmente en un gel soportado entre dos cristales en vertical. Debido al uso de SDS, las proteínas se desnaturalizan y se cargan negativamente proporcionalmente a su tamaño (masa). Además, el tratamiento de las proteínas previo a la separación va acompañado de la reducción de sus puentes disulfuro utilizando ditioneitol (DTT) o betamercaptoetanol (BME), que facilitará la acción del SDS. Posteriormente, al ser sometidas a un campo eléctrico, todas presentarían, en principio, la misma movilidad hacia el ánodo, de manera que sólo la presencia de una matriz como un gel de poliacrilamida que impida su libre movimiento, hará que existan diferencias entre la migración de moléculas de distinto tamaño (a menor tamaño, y por tanto peso molecular, mayor movilidad). En función del grado de entrecruzamiento del polímero, se conseguirán prestaciones diferentes en cuanto a los rangos de separación efectivos.

Respecto al IEF, se suelen emplear tiras de un gel en el que se inmoviliza un gradiente de pH (IPG), utilizando para ello una serie de anfolitos. A continuación, se aplica una diferencia de

potencial, consiguiendo que las proteínas se separen en función de su punto isoeléctrico. En cualquier caso, el empleo de estas técnicas individualmente no suele proporcionar una resolución suficiente para la separación de mezclas complejas de compuestos, por lo que suele acudir a la combinación de ambas (IEF x SDS-PAGE), la 2-DE.

Habitualmente, para la visualización de las proteínas en el gel tras la separación suelen emplearse métodos de tinción basados en el uso de reactivos de sensibilidad diversa que reaccionan con ciertos grupos de las proteínas, proporcionando color, como el azul de coomassie (CBB), que detecta bandas de 20-50 ng de proteína; la plata coloidal (capaz de detectar bandas de 1 ng; o empleando reactivos fluorescentes como Spyro[®] Ruby (detecta 1 ng) o Flamingo[®] (detecta 0.5 ng). Cabe destacar una modalidad alternativa de IEF, que es la llamada OFFGEL[®] (IEF en disolución, sIEF). En dicho caso, la separación se basa en IEF, pero tras la separación, las proteínas se extraen del gel a una disolución contenida en compartimentos situados sobre la tira. De esta forma, las proteínas (o péptidos) quedan en disolución y se facilita su posterior análisis por otras técnicas como HPLC-MS.

Sin embargo, la dificultad del empleo de estas técnicas en metaloproteómica reside en la necesidad de conservar a lo largo de todo el proceso el enlace metal-proteína. En muchas ocasiones los complejos entre metales y proteínas son lábiles y pueden destruirse o incluso intercambiarse con impurezas metálicas del gel, durante la separación (la propia corriente eléctrica y las condiciones desnaturizantes podrían afectar al enlace metal-biomolécula) y el proceso de fijación de proteínas, tinción o destinción.^{310, 311} Por este motivo, se propone en ocasiones emplear condiciones más suaves como no desnaturizantes y no reductoras (electroforesis nativa), emplear reactivos ultrapuros, e incluso evitar la tinción de los geles.²⁹⁷ La aplicación de PAGE supone la pérdida de resolución que va asociada a SDS-PAGE, al presentar cada proteína su carga intrínseca, y por tanto, al ser separadas en función de su m/z. Este problema se soluciona en parte aplicando la técnica nativa “*Blue Native*” BN-PAGE, en la que las proteínas se dotan de carga y se visualizan simultáneamente sustituyendo el SDS por Azul de Coomassie durante la separación. En cualquier caso, la aparición de estos problemas depende de la naturaleza del enlace. Así, para elementos que establecen enlaces covalentes con las proteínas, como el Se³¹²⁻³¹⁶ o el P,³¹⁷⁻³²¹ no existe riesgo de alteración y pueden estudiarse empleando métodos de separación desnaturizantes. Sin embargo, para metales unidos no covalentemente, por enlaces coordinativos, será necesario aplicar las precauciones mencionadas en mayor o menor medida, en función de su robustez. Este es el caso, por ejemplo, de proteínas que ligan Fe, Cu o Zn, cuyo enlace se ve afectado extensamente por condiciones desnaturizantes y por métodos de tinción como CBB o plata, incluso impidiendo por completo

su posterior detección.³¹⁰ Por ese motivo, en numerosos casos se planteó el estudio de este tipo de metaloproteínas empleando PAGE, BN-PAGE o IEF nativo, tanto en 1D como en 2D.³²²⁻³²⁶

Inicialmente se planteaba la detección específica de metales o metaloides en los geles mediante auto-radiografía, que requiere el uso de isótopos radiactivos (⁷⁵Se, ³⁵S, ³¹P). Otra opción es el empleo de XRF o PIXE aunque este tipo de instrumentación es aún poco accesible.²⁰⁸ Sin embargo, desde su propuesta en 1998 por Nielsen y col,³²⁷ el empleo de LA-ICP-MS se ha convertido en una alternativa asequible y apropiada. Mediante esta técnica, puede obtenerse un electroferograma en el que se represente la intensidad de señal de cierto elemento en función de su posición en el gel. Se trata de un método que puede ser rápido y robusto y que, al ser aplicado directamente sobre el gel, ofrece señales que serán teóricamente proporcionales a la cantidad de analito y elimina los problemas relacionados con la recuperación de proteínas del gel. Además, este acoplamiento evita tener que cortar y mineralizar trozos o bandas de gel para su análisis por ICP-MS, que sería una alternativa menos inmediata y de menor resolución. Otra opción en el caso de que se aplique una separación 1D en geles contenidos dentro de tubos de vidrio, es el acoplamiento GE-ICP-MS, que permite transferir los analitos según van siendo separados y eluidos en el gel a una disolución que se introduce en línea al ICP-MS, de manera que puede realizarse de forma simultánea la separación, detección y cuantificación de biomoléculas.^{328, 329}

Otra interesante estrategia de detección de metaloproteínas separadas en los geles puede plantearse mediante el empleo de LA-ICP-MS, lo cual puede realizarse en diversos modos. En el caso de geles 1D, se suele escanear longitudinalmente el carril de la muestra de principio a fin. Si se trata de geles 2D, puede optarse por el modo de salto de “*spot*” en “*spot*”,³¹⁹ para lo cual las proteínas deben ser visibles, y por tanto estar teñidas, o bien puede obtenerse una imagen completa de una sección de gel^{324, 330} y, por ende, de la totalidad del gel, lo cual no requiere que el gel esté teñido (minimizando la pérdida de ciertos elementos) pero supondría tiempos de análisis más largos. Para efectuar el escaneado de cada línea además puede emplearse el modo de ablación con el desplazamiento continuo del láser o en modo de rastreo (*raster*), muestreando a intervalos espaciales. El modo *raster* puede mejorar la sensibilidad del análisis pero resulta menos indicado que el modo continuo de escaneado para discernir posibles contaminaciones puntuales en el gel (por ejemplo debido a la deposición de polvo) o el ruido electrónico.³¹⁰ El modo de análisis de imagen de un gel, aunque puede llevar varias horas, permite detectar señales elementales incluso en zonas de gel donde no se aprecien visualmente proteínas, incrementando la información obtenible. Para disminuir los límites de detección, puede utilizarse un instrumento de ICP-(SF)-MS, aunque para el análisis multielemental es preferible utilizar en dicho caso un

multicolector de iones. Sin embargo, el elevado precio de este tipo de instrumento hace que el número de aplicaciones sea inferior a las de los ICP-MS con analizador de Q. También puede mejorarse la sensibilidad empleando técnicas más recientes que utilizan un láser de alta frecuencia (fs, en lugar de los láseres convencionales de ns) y efectuando un análisis en “Z”, lo que puede resultar en el aumento de la cantidad de material ablacionado en la escala del tiempo, y por tanto, un incremento en la sensibilidad obtenida.³³¹

La ablación puede efectuarse directamente sobre el gel, aunque el secado previo del mismo es necesario dado el gran contenido de agua en el mismo, que al ser bombardeado por el láser se evapora continuamente, resultando en una superficie irregular. En muchas ocasiones se plantea un secado entre capas de celofán o sobre papel de filtro en un desecador.³²⁴ Sin embargo, esto conduce a geles sumamente frágiles, lo cual podría ser un problema durante el análisis de imagen en modo de línea continua. Otra alternativa recientemente propuesta es su tratamiento con glicerol y calentamiento, generando un gel flexible. Este método parece conservar los complejos metal-proteínas a diferencia de otros tipos de tratamientos.³¹⁰ Otra opción utilizada es la transferencia de las proteínas separadas en el gel a una membrana, por ejemplo de nitrocelulosa, mediante “*electroblotting*”, y el posterior análisis de la misma con LA-ICP-MS.^{332, 333} Esto elimina los problemas relacionados con la posible deformación del gel durante su secado y además permite la preconcentración de los analitos en la superficie de la membrana, favoreciendo su ablación completa. En el caso de geles secados, podría observarse una ablación parcial del material, limitado a la parte superficial, lo que produciría un aumento en los límites de detección. Además, la transferencia de las proteínas a una membrana soluciona los problemas asociados a los altos ruidos de fondo en los geles cuando se monitoriza S o P debido a la presencia de estos elementos en reactivos implicados en la polimerización de los geles (persulfato amónico), o en los tampones electroforéticos (SDS), o incluso en la tinción (H_3PO_4).²⁰⁸ Para el análisis de muestras de gran tamaño, como es el caso de los geles electroforéticos, existen diseños comerciales de celdas de ablación de grandes dimensiones que presentan tiempos de lavado de la celda con el gas portador suficientemente cortos para evitar la pérdida de resolución en el electroferograma.³³⁴

Para la cuantificación de las metaloproteínas en el gel,³²³ se han propuesto diversos métodos de calibrado: por un lado, se ha propuesto polimerizar geles enriquecidos en cierto elemento,³³⁵ rehidratar los geles deshidratados con disoluciones patrón de ciertos elementos,³³⁶ cargar en los geles metaloproteínas patrón con contenido elemental conocido,³³⁷ e incluso se han propuesto métodos de calibración en disolución, por los que se introduce un estándar a través de un nebulizador ultrasónico acoplado a la cámara de ablación láser. Además, la señal puede ser

normalizada empleando la del ^{13}C , 336 o un patrón interno añadido al gel, como el Co ,³³⁸ sin embargo, estos no tienen en cuenta la distribución heterogénea en la profundidad del gel, por lo que es preferible usar un patrón interno intrínseco a las proteínas, como el S .³³⁸

Una vez detectadas las metaloproteínas, ha de procederse a su identificación. En la Figura 24 se esquematiza la estrategia de identificación de metaloproteínas separadas en geles electroforéticos. En este caso, los spots conteniendo las proteínas de interés pueden ser recortados y digeridos en gel para efectuar el análisis de los péptidos resultantes por MS/MS y su identificación, como se detalla en el apartado 2.6.1. Sin embargo, para una asignación inequívoca de la identidad de las metaloproteínas detectadas, es necesario contar con una prueba de la presencia de la especie metálica: ya sea detectando metalopéptidos en el espectro de masas, o alternativamente aplicando XAS directamente en gel, para poder demostrar el enlace metal-proteína. De esta manera, combinando PAGE o 2-DE con LA-ICP-MS y MALDI-MS o ESI-MS se han identificado proteínas en spots proteicos con Se , P , Fe , Cu , Zn , Ag , Mg , Na , Sr , Ti , Ca , Ni , Pb o Cd en diversos tipos de muestras. Sin embargo sólo se han llegado a detectar péptidos que conservaban la modificación del metal/metaloide en el caso del Se ³¹³ y P ^{253, 317, 319, 320} y en sólo en algún caso con Zn , Fe o Cu ,^{253, 326, 339} mientras que en la mayoría de los casos no se pudieron detectar dichos péptidos, posiblemente por una falta de sensibilidad.^{322, 324, 325, 330, 333, 339}

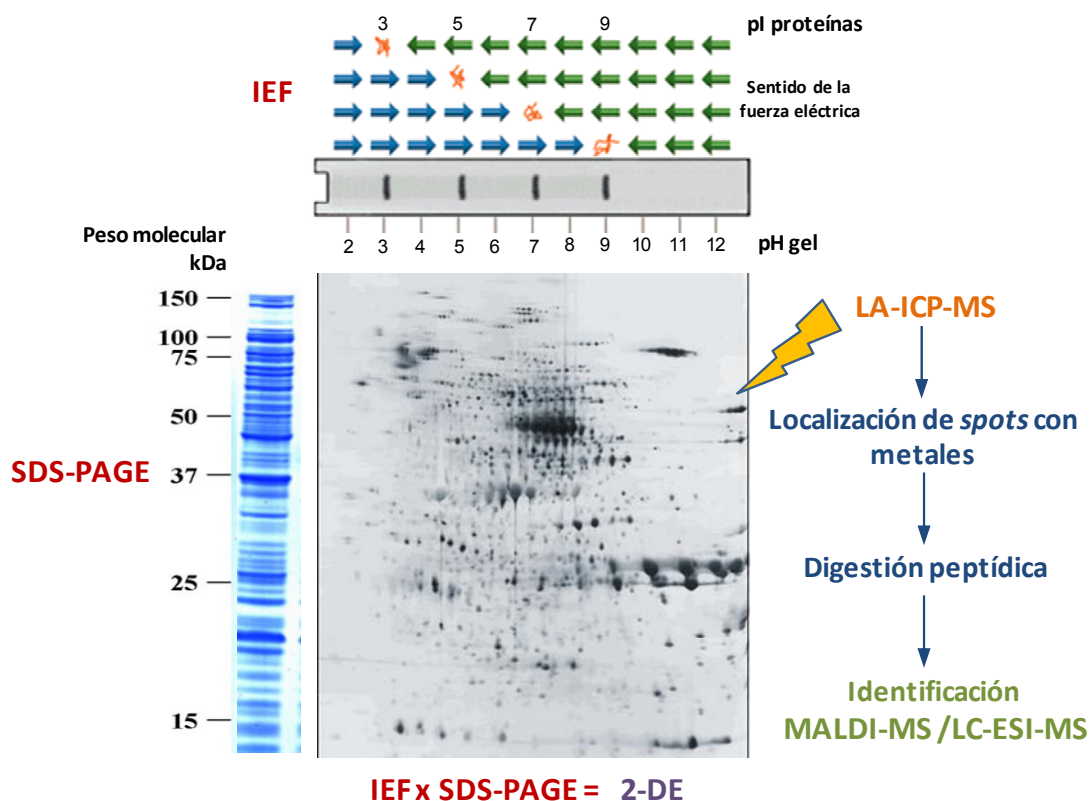


Figura 24. Estrategia general para la separación, detección e identificación de metaloproteínas empleando geles electroforéticos.

En el caso de los complejos de proteínas con Pt generados durante tratamientos con compuestos antitumorales de Pt, existen escasos estudios efectuados con electroforesis en gel y LA-ICP-MS. Aunque la intensidad de señales de Pt para muestras de suero tratado con cisplatino resultó ser algo superior al ser separada por PAGE en comparación con SDS-PAGE,^{311, 340} en algunos otros casos se han aplicado condiciones desnaturalizantes.⁵⁷ Mediante la aplicación de PAGE y 2-DE, LA-ICP-MS y ESI-MS se estudió un suero incubado con cisplatino, identificando HSA; Tf o α -2-macroglobulina como las proteínas de las bandas platinadas detectadas.³⁴⁰ Además empleando SDS-PAGE en condiciones no reductoras se llegó a identificar para un extracto de *E. coli* incubado con cisplatino la proteína OmpA en una banda con Pt detectada por LA-ICP-MS.⁵⁷ Un aspecto que habrá que considerar es la posible contaminación del gel proveniente de los electrodos de Pt de los sistemas electroforéticos. Esto es especialmente problemático en sistemas horizontales,³⁴¹ con mayor superficie de contacto, y parece minimizarse en sistemas verticales, que utilizan electrodos de hilo de platino, con un mínimo contacto con el gel.³¹¹ Otra posible solución es el empleo de otro tipo de electrodos como los de Cu Au.³⁴¹

2.5. Métodos de preparación de muestra para estudios de (metalo)proteómica

En investigación biomédica es frecuente el empleo de animales, como ratas o ratones, como modelos para el estudio de enfermedades, su tratamiento, y procesos fisiológicos relacionados, ya que suelen presentar un comportamiento similar al de los sistemas humanos. Partiendo de cierto modelo escogido, un estudio proteómico se puede centrar en un tejido relacionado con la patología objeto de estudio, o en un fluido corporal (sangre, suero o plasma, orina, saliva). La obtención de tejidos humanos es más compleja, aunque es posible estudiar tejidos biopsiados o post-mortem, o de forma más sencilla, ciertos fluidos. Cuando se manejan tejidos frescos, es fundamental retirar todo tejido conectivo y graso, además de efectuar la perfusión antes de proceder a su excisión (para eliminar restos sanguíneos) y el lavado de los mismos con una disolución de 0.9 % NaCl, en frío (4°C). A continuación, es conveniente su congelación en N₂ líquido y mantener los tejidos a -80°C hasta su uso. Sin embargo, la heterogeneidad, y complejidad de un tejido es elevada, más aún cuando además puede presentar cierta variedad de tipos celulares que incrementen la diversidad de proteínas presentes (alrededor de 10⁴ proteínas se expresan en una sola célula), y por tanto compliquen el análisis proteómico. Por este motivo, en ciertos casos se plantea una simplificación del modelo, haciendo uso de cultivos celulares (obtenidos primariamente a partir de células aisladas extraídas de tejidos) con

los que puede estudiarse un determinado tipo celular sin la complejidad del tejido completo, lo cual puede facilitar el estudio de proteínas minoritarias. En numerosas ocasiones los cultivos celulares son útiles para evaluar los efectos celulares de fármacos o tóxicos, dada su homogeneidad, haciendo fácilmente comparables muestras control y tratadas.

En cualquier caso, para un estudio en proteómica es necesario producir una ruptura de las células (lisis) y una extracción de las proteínas, dejándolas en disolución, de manera que la recuperación sea máxima. Para producir la ruptura y homogeneización celular pueden aplicarse diversos métodos, tanto mecánicos (homogeneizadores de tipo rotor-estator, de tipo Potter-Elvehjem, licuadoras, etc.); ultrasónicos; de presión; o los basados en la lisis de las membranas celulares por presión osmótica, empleando detergentes o efectuando choques térmicos. Por otra parte, las proteínas han de solubilizarse en un medio de extracción apropiado. Para evitar la modificación de las proteínas o procesos de agregación o precipitación, que pueden conducir a pérdidas y a la aparición de artefactos, es necesario utilizar diversos agentes como caotrópicos, detergentes, agentes reductores e inhibidores de proteasas. Los agentes caotrópicos, como la urea, tiourea o hidrocloreuro de guanidina, rompen los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofílicas, desplegando las proteínas (desnaturalizándolas) y exponiendo todos sus residuos ionizables. Por otro lado, los detergentes deshacen las interacciones hidrofóbicas, facilitando la extracción y solubilización proteica, pudiendo tratarse de compuestos iónicos (SDS), no iónicos (Triton X-100) o zwitteriónicos (CHAPS). Además, suelen utilizarse agentes reductores capaces de romper los puentes disulfuro entre residuos cisteínicos, facilitando la apertura de las proteínas y el análisis de subunidades individuales. Entre estos destacan el ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), tributilfosfina (TBP), triscarboxietilfosfina (TCEP) o β -mercaptoetanol (BME). Asimismo, es necesario evitar la acción de proteasas endógenas que pudieran ser liberadas o activadas durante la ruptura celular y que pueden provocar la degradación enzimática de las proteínas. Por tanto, para minimizar este problema es recomendable añadir inhibidores de proteasas a la disolución de extracción de proteínas y/o mantener la muestra en frío (0-4°C) en todo momento. Es frecuente la adición de un agente quelatante como el EDTA tanto en el cocktail inhibidor de proteínas (para inactivar ciertas metaloproteasas), como en la disolución extractante, para secuestrar los iones de Ca^{2+} que frecuentemente están involucrados en la adhesión entre células. Por otro lado, también será necesario ajustar el pH y la fuerza iónica de la disolución extractante, ya que esto tendrá influencia en la solubilidad de las proteínas. Generalmente se utilizan tampones Tris, HEPES o bicarbonato amónico a un pH alrededor de 6-9, y se puede incluir NaCl o KCl para ajustar la fuerza iónica. La elección del tipo de homogenización y la composición de la disolución extractante dependerá del tipo de muestra, del

objetivo del estudio y del tipo de procesamiento posterior a realizar en la muestra del lisado celular. Aunque de la manera descrita puede obtenerse un lisado completo celular, en ciertas ocasiones puede además realizarse un fraccionamiento subcelular, generalmente conseguido por centrifugación, con objeto de estudiar la composición compartimentalizada en la célula.

En el caso de un fluido como la sangre, es frecuente la obtención de fracciones como suero o plasma. El suero es una fracción obtenida tras la coagulación y centrifugación de la sangre, sin la adición de anticoagulantes, es decir es la fracción desprovista de glóbulos rojos y blancos y los factores de coagulación. El plasma, sin embargo, es la fracción obtenida tras recoger la sangre empleando diversos anticoagulantes, de manera que se trata de la fracción libre de glóbulos rojos y blancos. En el estudio de muestras de plasma/suero hay que considerar que presenta una serie de proteínas mayoritarias que representan el 90 % de la totalidad (albúmina, transferrina, inmunoglobulinas, antitripsina, haptoglobina). Esto puede dificultar o imposibilitar la identificación de proteínas minoritarias, por lo que con frecuencia se acude a estrategias para eliminar estos componentes mayoritarios, por ejemplo, utilizando cromatografía de afinidad. Respecto a esto, son comunes los *kits* de depleción de albúmina o inmunoglobulinas en suero sanguíneo.

La aplicación de estos métodos de preparación de muestra comunes en proteómica para estudios de metaloproteómica será dependiente de la estabilidad de los complejos metal-proteína, por lo que han de ser evaluados en cada caso. Si el empleo de agentes desnaturalizantes, de ciertos reductores con grupos que puedan reaccionar con metales, o de agentes complejantes pudiera suponer un riesgo para la conservación de los complejos metal-proteína, será necesario prescindir de ellos, empleando métodos lo menos agresivos posible. Incluso el tipo de homogeneización celular a aplicar podrá influir en este aspecto y debe ser examinado.

La presencia de sales, detergentes, tampones u otros contaminantes (lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos) ya sea intrínseca (como en orina o sangre, en cuanto a un alto contenido salino) o introducida en la disolución extractante empleada, puede ser problemática en determinadas etapas del análisis. Por este motivo, será necesaria su eliminación previa a ciertas separaciones, digestiones enzimáticas o análisis por espectrometría de masas. En el caso de las sales, éstas pueden ser eliminadas mediante diálisis, microdiálisis, ultrafiltración, filtración en gel, precipitación de proteínas o extracción en fase sólida. Mediante la adición de ácido tricloroacético, acetona o cloroformo/metanol puede conseguirse una precipitación selectiva de las proteínas en una muestra, de forma que además de eliminar las sales, otros contaminantes pueden ser excluidos efectivamente como detergentes, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos nucleótidos metabolitos y otras moléculas iónicas. Tras la precipitación y centrifugación, el

precipitado proteico puede recuperarse y resuspenderse en una disolución apropiada. Este método es muy frecuente para la preparación de proteínas previa a 2-DE. Por otro lado, la extracción en fase sólida (SPE) es un método rápido y sencillo que permite tanto la purificación de la muestra (para eliminar sales, detergentes y caótopos) como la preconcentración de la misma. Generalmente se basa en rellenos de fase inversa, como resinas de C₁₈, existiendo también a escala micropreparativa (μ -SPE), como las puntas de micropipeta conteniendo un relleno de esta clase, como los ZipTip[®], OMIX[®] o Gelloader[®]. Éstas pueden ser de gran utilidad para la preparación de una muestra proteica o peptídica previamente a los análisis mediante ESI-MS o MALDI-MS, pudiendo eluir los analitos en disoluciones orgánicas ácidas volátiles compatibles con estas técnicas. Sin embargo, previamente a su empleo puede ser conveniente la eliminación de algunos contaminantes que pudieran ocasionar un bloqueo en el relleno durante la extracción.

Dado que las muestras pueden presentar una gran cantidad de proteínas en un rango de concentraciones muy amplio, en muchos casos es necesario llevar a cabo prefraccionamientos (aislamiento de ciertas bandas electroforéticas o fracciones cromatográficas), enriquecimientos selectivos (como inmunoprecipitación de ciertas proteínas, o atrapamiento selectivo de fosfopéptidos en lechos de TiO₂) o una depleción de ciertas proteínas con objeto de reducir su complejidad; y de métodos subsiguientes de preconcentración de proteínas. En algunos casos, la evaporación de disolvente puede ser útil para una preconcentración, pero afecta a todos los componentes de la muestra, incluidos contaminantes. Además de la utilidad para esto de la SPE, la ultrafiltración empleando membranas con un corte molecular determinado también puede ser aplicable para la preconcentración en muestras proteicas, además de para la eliminación de sales y para propiciar un cambio en la composición del disolvente de la muestra.

2.6. Aproximaciones proteómicas basadas en la espectrometría de masas para la caracterización de metaloproteínas

Las estrategias para la identificación de proteínas más comunes en proteómica están basadas en el empleo de espectrometría de masas molecular y pueden clasificarse en dos categorías: “*bottom-up*” (centrada en el análisis de péptidos producidos enzimática- o químicamente) y “*top-down*” (basada en el análisis de proteínas íntegras). Para el estudio de muestras biológicas, se introducen en estas aproximaciones diferentes etapas de separación de las proteínas o péptidos, que se resumen en la Figura 25 y se detallan en las secciones 2.6.1. y 2.6.2. La metaloproteómica puede hacer uso de esas mismas técnicas siempre que se garantice la

conservación del enlace metal-proteínas original y la identidad de los complejos a lo largo de las diferentes etapas de tratamiento de muestra y análisis. Además, la introducción del ICP-MS en estas estrategias servirá como herramienta para facilitar la identificación de las especies metaladas o conteniendo un heteroátomo.

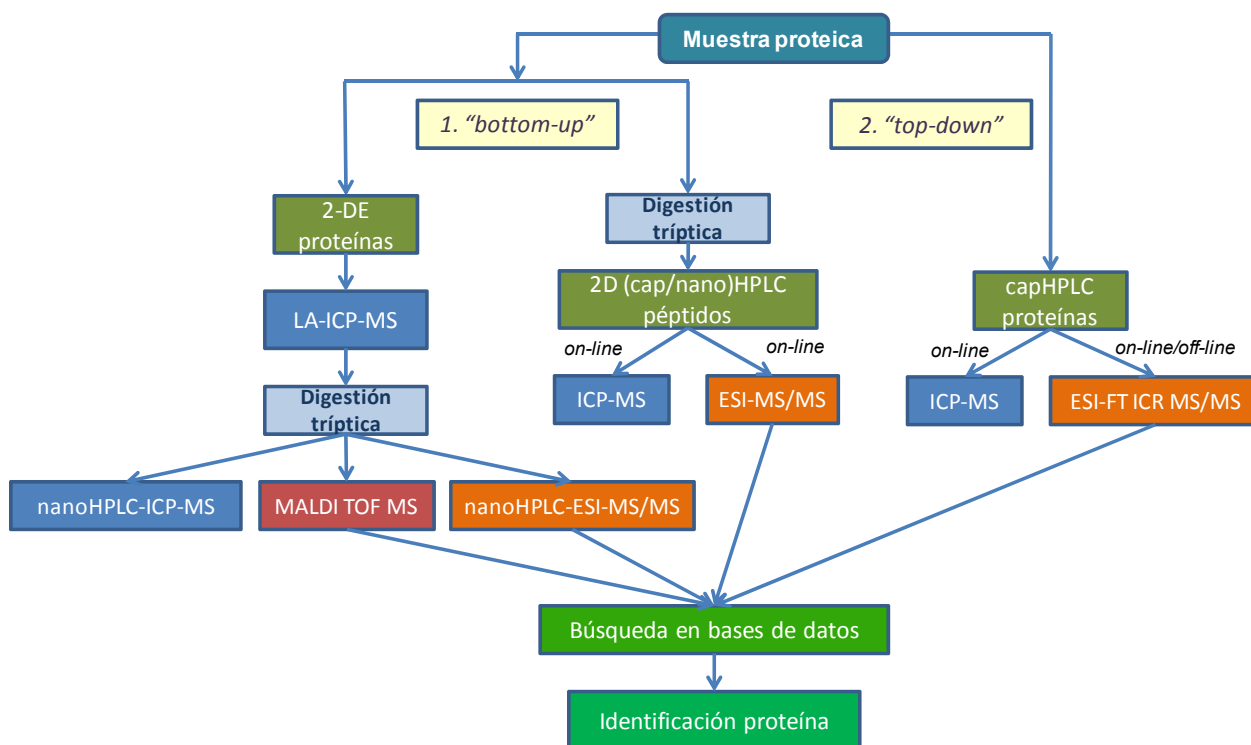


Figura 25. Resumen de las estrategias “bottom-up” y “top-down” basadas en MS para la identificación de proteínas, con la introducción de ICP-MS para la búsqueda de metaloproteínas.

2.6.1. Aproximación “bottom-up”

La aproximación “bottom-up” es actualmente la que presenta un uso más extendido en proteómica. Se basa en la detección de los péptidos generados a partir de proteínas y en la obtención de información acerca de sus masas o secuencias para identificarlas. Generalmente existen dos estrategias posibles. Por un lado, puede efectuarse un fraccionamiento y separación de las proteínas, frecuentemente 2-DE, seguido de la digestión de las mismas en gel o en disolución.³⁴² Para llevar a cabo la digestión, la proteína es tratada con un agente proteolítico (Tabla 6), que puede tratarse de una proteasa o un agente químico de mayor o menor especificidad, que produzca cortes predecibles en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Habitualmente suele emplearse la tripsina, por las características de los péptidos producidos, muy adecuados para su análisis por MS. Además, para facilitar la digestión, suelen llevarse a

cabo etapas previas de desnaturalización de las proteínas con agentes como SDS, urea o tiourea; reducción de puentes disulfuro con BME o DTT; y alquilación de cisteínas libres con yodoacetamida o ácido yodoacético para evitar su reoxidación. Tras la digestión, los péptidos producidos se analizan bien directamente por MS, para determinar sus masas e identificar la proteína por PMF (*peptide mass fingerprinting*); o bien mediante LC-MS/MS.

Tabla 6. Agentes proteolíticos para la digestión de proteínas y su secuenciación.

	Agente proteolítico	Especificidad	Condiciones de digestión [buffer, pH, T (°C)]
Agentes químicos	Bromuro de cianógeno	Met-X	70% TFA
	N-clorosuccinimida	Trp-X	50% ácido acético
	N-bromosuccinimida	Trp-X	
Proteasas de alta especificidad	Tripsina	Arg-X, Lys-X	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 7.8, 37
	Endoproteinasa Glu-C	Glu-X	
	Endoproteinasa Arg-C	Arg-X	
	Endoproteinasa Lys-C	Lys-X	
	Endoproteinasa Asp-C	X-Asp	
Proteasas no específicas	Quimotripsina	Phe-X, Tyr-X, Trp-X, Leu-X	
	Termolisina	X-Phe, X-Leu, X-Ile, X-Met, X-Val, X-Ala	
	Pepsina	Phe-X, Tyr-X, Trp-X, Leu-X, Met-X	0.01 M HCl, 2.0, 37
	Elastasa	Amplia especificidad	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; -, 37

Una segunda estrategia, denominada “*shotgun*” consiste en efectuar la digestión directamente en el extracto proteico de la muestra sin efectuar pasos separativos previos. A continuación los péptidos se separan mediante una técnica multidimensional acoplada en línea a MS/MS. En el caso del empleo de 2D-LC-ESI-MS/MS, la estrategia “*shotgun*” se conoce como MudPIT³⁴³ (*multidimensional protein identification technology*), la cual se ha utilizado para el análisis de lisados celulares completos, organismos, extractos tisulares o fracciones subcelulares, realizando separaciones mediante AE y RP acoplados en línea. Sin embargo, con la estrategia “*shotgun*” se produce, una mezcla de péptidos de gran complejidad que requieren separaciones de alta resolución y un sistema de detección muy sensible. Además, se pierde información al transformar todas las proteínas en una mezcla de péptidos, lo que puede dificultar la correcta

identificación, más aún cuando no todos los péptidos producidos durante la digestión pueden ser observados o correctamente identificados. Por otro lado, existirá cierta preferencia en la detección de péptidos que estén presentes en la muestra con elevada abundancia relativa.

El paso siguiente consiste en la identificación de las proteínas mediante la búsqueda a través de SEQUEST o MASCOT, que emplean un algoritmo que permite la comparación de los resultados experimentales con aquellos producidos por la digestión *in silico* de las proteínas recogidas en bases de datos obtenidas por secuenciación genómica. Por un lado, puede realizarse la búsqueda con las masas observadas para los péptidos presentes en la digestión, por comparación con las de aquellos péptidos generados teóricamente por todas las posibles proteínas introducidas en la base de datos (identificación mediante la huella peptídica, PMF). Por otro lado, también puede realizarse la búsqueda con los resultados de los experimentos MS/MS y conocerse la secuencia de los péptidos fragmentados utilizando un algoritmo que sea capaz de comparar los fragmentos observados con aquellos predecibles a partir de los péptidos generables a partir de las proteínas presentes en cierta base de datos. Además es posible realizar la secuenciación “*de novo*” manual o asistida por un programa informático, de los péptidos generados.

Como ya se ha comentado, ICP-MS puede adquirir un papel relevante para la detección de *spots* proteicos metalados después de la separación 2-DE. Además servirá para monitorizar específicamente los péptidos metalados, a través de su acoplamiento a su separación por LC, en paralelo a LC-ESI-MS/MS. De esta forma, se obtiene información acerca de los tiempos de retención de dichos péptidos, trasladable a los cromatogramas LC-ESI-MS/MS, donde además se reconocerán en base a su perfil isotópico e identificarán mediante sus espectros de fragmentación MS/MS. Considerando la masa del residuo metálico correspondiente como posible modificación de las masas de los residuos de aminoácidos, de manera análoga a como se trataría cualquier posible modificación, podrá obtenerse la posición de los residuos metálicos en la secuencia de aminoácidos obtenida a través de experimentos MS/MS.

Teóricamente, también será posible automatizar la búsqueda de los péptidos metalados empleando un motor de búsqueda como SEQUEST, en el que se introduzcan como modificaciones variables sobre los residuos de ciertos aminoácidos, las masas de los restos metalados (el metal y los correspondientes ligandos que porte) que puedan coordinarse a la proteína. Por ejemplo, empleando 2D-HPLC(AE/RP)-ESI-LTQ-MS/MS (MudPIT) se separaron y analizaron los péptidos resultantes de la digestión triptica de extractos proteicos de células de *E. coli*^{86, 87} incubadas *in vitro* con cisplatino (1 mM o 50 μ M) o bien de suero sanguíneo²⁶ incubado con el fármaco (20 μ M, relación molar Pt:proteínas 10:1). Mediante la búsqueda

asistida a través de SEQUEST, introduciendo como modificaciones variables las masas de distintos posibles residuos de Pt ($[\text{Pt}]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$), sobre diversos aminoácidos (Cys, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser, Thr y Tyr), se identificaron sendos péptidos con platino y, como resultado, las correspondientes proteínas platinadas.

Sin embargo, dada la complejidad en la búsqueda automática con un elevado número de modificaciones variables posibles, además de la necesidad de emplear una tolerancia en la masa del ión precursor elevada durante la búsqueda con objeto de corregir las posibles asignaciones incorrectas en el pico monoisotópico precursor, el empleo de este método puede suponer un proceso de búsqueda lento. Además, puede resultar en numerosas asignaciones incorrectas e incluso ciertas asignaciones correctas podrían presentar puntuaciones bajas, debido a la complejidad en los fragmentos producidos para un péptido con un metal con diversos ligandos, que pueden ser perdidos durante la fragmentación. Por estos motivos, siempre es necesario efectuar comprobaciones manuales de los resultados e incluso no descartar que este método automatizado pueda no ser capaz de detectar determinados péptidos metalados.

2.6.2. Aproximación “*top-down*”

Esta estrategia se basa en la ionización en fase gaseosa de proteínas intactas, seguido de la medida de su masa exacta haciendo uso de un espectrómetro de masas de alta resolución, y de su fragmentación directa sin efectuar una previa digestión. De esta forma, la secuencia completa de la proteína puede examinarse y, por tanto, teóricamente se podría caracterizar de forma más completa las isoformas de proteínas y sus PTMs, en comparación con la aproximación “*bottom-up*”. Esta aproximación permite una identificación directa de las PTMs en base a la diferencia de masas entre la experimental y la predicha por la secuencia determinada por el DNA. Para la fragmentación de proteínas intactas fue fundamental el desarrollo de ECD, que ha mejorado la eficiencia de disociación de proteínas pequeñas y medianas. En el caso de proteínas grandes, su análisis directo es complicado debido a su compleja estructura terciaria con numerosas interacciones no covalentes, sin embargo, recientemente se ha propuesto el análisis de proteínas de más de 200 kDa, aplicando una predisociación.³⁴⁴ De forma análoga, se habla de una aproximación “*middle-down*” que propone hacer un paso previo de digestión limitada que proporcione péptidos grandes de más de 5 kDa, seguido de su fragmentación.³⁴⁵ La identificación se puede realizar efectuando una posterior búsqueda en una base de datos en base a la masa de la proteína íntegra y de sus iones fragmento observados durante experimentos MS/MS aplicados sobre el ion precursor de la proteína. En muchas ocasiones, esta aproximación

se aplica realizando una infusión directa de una sola proteína o una mezcla sencilla de proteínas, después de una separación previa en línea.³⁴⁶ Sin embargo, también se ha propuesto recientemente el acoplamiento en línea de la separación a nivel de proteínas a un MS empleando un LTQ-FT ICR.³⁴⁷

En este caso, también puede implementarse el empleo de ICP-MS para estudios de metaloproteómica con la aproximación “*top-down*” para monitorizar la separación de las metaloespecies previa a su análisis por ESI-MS/MS, como se ha comentado en el apartado 2.4.2.

Una ventaja de su aplicación en metaloproteómica es que al permitir trabajar con metaloproteínas completas, evita tratamientos de muestra que pudieran producir la alteración de los posibles enlaces metal-proteína que estuviesen presentes originalmente. Sin embargo, debido a las limitaciones instrumentales y de los métodos de fragmentación, y a la creciente complejidad de los espectros de fragmentación en función del peso molecular de la proteína, esta aproximación está normalmente restringida al estudio de proteínas pequeñas. Además, la caracterización estructural completa de un complejo metal-proteína requiere un grado elevado de fragmentación de la secuencia completa y superior al que requeriría sólo la identificación de una proteína.

El uso de la aproximación “*bottom-up*” es claramente ventajoso en cuanto a la interpretación de los espectros producidos, por su mayor simplicidad. Sin embargo, para su uso en metaloproteómica es necesario cerciorarse de que el enlace metal-proteína se mantiene inalterado durante el proceso de digestión, que supone emplear tampones y reactivos diversos que podrían modificar los enlaces metal-proteína iniciales. Desde este punto de vista, la aproximación “*top-down*”, siempre que sea aplicable, es en principio una opción preferible, aunque es preciso evaluar la aplicabilidad de la estrategia “*bottom-up*”.

3. ARTÍCULO DE REVISIÓN

Trabajo 1

“Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs”

Metallomics (2010) 2, 19-38

Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs

Diego Esteban-Fernández,^b Estefanía Moreno-Gordaliza,^a Benito Cañas,^a María Antonia Palacios^a and María Milagros Gómez-Gómez^{*a}

Received 10th June 2009, Accepted 27th October 2009

First published as an Advance Article on the web 9th November 2009

DOI: 10.1039/b911438f

Pt-containing drugs are nowadays essential components in cancer chemotherapy. However, drug resistance and side effects limit the efficiency of the treatments. In order to improve the response to Pt-based drugs, different administration strategies or new Pt-compounds have been developed with little success. The reason for this failure could be that the mechanism of action of these drugs is not completely understood. In this way, metallomics studies may contribute to clarify the interactions of Pt-containing drugs within the organism. This review is mainly focused on the role of Analytical Chemistry on the study of the interactions between Pt-based drugs and biomolecules. A summary of the analytical techniques and the most common sample treatment procedures currently used in metallomics studies of these drugs is presented. Both are of paramount importance to study these complex samples preserving the drug–biomolecule interaction. Separation and detection techniques must be carefully selected in order to achieve the intended goals. The use of multidimensional hyphenated techniques is usually necessary for a better understanding of the Pt-based drugs interactions in the organism. An overview of Pt-drugs biological interactions is presented, considering the different sample matrices and the drugs course through the organism. Samples analysed in the included studies are blood, urine, cell cytosol, DNA as well as the drugs themselves and their derivatives. However, most of these works are based on *in vitro* experiments or incubations of standards, leading in some cases to contradictory results depending on the experimental conditions used. Though *in vivo* experiments represent a great challenge due to the high complexity and the low concentrations of the Pt-adducts in real samples, these studies must be undertaken to get a deeper understanding of the real interactions concerning Pt-containing drugs.

1. Introduction

Most of the trace elements in biological systems are bound to biomolecules. Metal-binding compounds play essential roles acting as biological catalysts that regulate reactions and physiological functions in cells and organs. For instance, the metalloproteins which catalyse biological reactions, called metalloenzymes, participate in important biological processes.¹ Metal-binding biomolecules are also present in degeneration processes: traces of Fe, Cu and Zn are involved in the growth of neurotoxic amyloid fibrils which allow the progression of Alzheimer's disease.² Furthermore, drugs containing metal atoms are frequently employed in medicine.³ Bi complexes have been successfully used therapeutically in antiulcer treatments;⁴ Au compounds are used on the treatment of rheumatoid arthritis,⁵ also exhibiting *in vivo* antitumor activity when gold is in oxidation state +1 or +3;⁶ and, finally, compounds with Ga,⁷ Ru,⁸ Rh,⁹ Sn¹⁰ and As¹¹ present antitumor

properties. Nowadays, the most powerful metallodrugs used are the Pt-containing compounds cisplatin, carboplatin or oxaliplatin, which are applied worldwide in the clinical practice.

The antitumor properties of cisplatin (*cis*-diaminedichloro-platinum(II)) were discovered in the 60's by Rosenberg *et al.*¹² and its clinical use was approved by the FDA in 1978. When DNA reacts with cisplatin, cross-linked adducts are produced, resulting in the distortion of its double-helix structure, with a global bending in the duplex of 35–40° and a local unwinding of 25° in the double helix.¹³ As a consequence of the DNA damage several cellular processes are disrupted, including transcription and replication, being cell death, either by apoptosis or necrosis, finally induced.¹⁴ As it has been recently summarised, there are four consecutive stages involved in the inhibition of the transcription by Pt-containing drugs: (1) cellular accumulation by both passive and active uptake; (2) activation of the Pt(II) complex; (3) binding to nucleic acids to form a variety of Pt-DNA adducts, and (4) the cellular response to DNA damage.¹⁴

Clinical treatments are limited by the toxic side effects such as nephrotoxicity, emetogenesis and neurotoxicity. Nephrotoxicity may be partially inhibited using administration protocols including a previous hydration of the patients with saline

^a Department of Analytical Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Av. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain.

E-mail: mmgomez@quim.ucm.es; Fax: + 34 91-394-43-29; Tel: + 34 91-394-51-46

^b Department of Chemistry, Humboldt-Universitaet zu Berlin, Brook-Taylor Str. 2, 12489 Berlin, Germany

solutions¹⁵ as well as varying the extension of the infusion times, volume and number of the dosages.¹⁶ Efforts have been made towards the improvement of cisplatin therapeutic properties, looking for minimising its side effects, and as a result, many new Pt-based drugs have been developed, some of them already approved for clinical use or under consideration for approval by regulatory authorities. Carboplatin (*cis*-diamine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II)), which was authorised by the FDA in 1989, is a second generation drug widely used to treat ovarian and lung cancers. Compared to cisplatin, carboplatin presents lower activity and toxicity, can be used more easily in combined therapies and is active against the same type of tumours. Oxaliplatin ((*trans*-RR-cyclohexane-1,2-diamine)oxalatoplatinum(II)), a third generation Pt-drug approved by the FDA in 2004, improves the toxic behaviour of cisplatin, does not present cross-resistance with cisplatin and is very effective against colon cancer.¹⁷ The main side effects of carboplatin and oxaliplatin are myelosuppression and neuropathy, respectively. Fig. 1 shows some other important Pt-based drugs. Tetraplatin, iproplatin and satraplatin (JM216) are Pt(IV) water soluble compounds, and therefore, suitable for oral administration. Specifically, satraplatin has been extensively studied¹⁸ and now is under consideration for approval by the FDA for hormone-refractory prostate cancer.¹⁹ Other promising Pt-drugs are nedaplatin, lobaplatin and picoplatin, the latter in Phase III of clinical trials for small-cell lung cancer.²⁰ New generation Pt-based drugs that do not follow the traditional structure–activity rules of

platinum cytotoxicity established by Cleare and Hoeschele in 1973²¹ are *trans*-compounds (JM335) or even polynuclear complexes (BBR3464).

The evolution of the number of publications involving cisplatin, oxaliplatin and carboplatin analysis in the last decades shows a great increase. This tendency is due not only to the current interest of the scientific community in Pt-based drugs, but also to the improvement of the analytical tools and methodologies used in such studies. A new discipline, Metallomics,²² is being developed to study the evolution of metal or metalloid species and their interaction in time and space with other type of molecules, including biomolecules, focusing both in qualitative and quantitative aspects. Consequently, the goals of metallomics are the determination of the metallome, which is defined as the entirety of metal and metalloid species within a cell or tissue type, and the elucidation of the physiological roles and functions in which any metallo-species may be implicated in a biological system.²³ Analytical Chemistry methodologies, techniques and instrumentation are essential for the study of metallomes.²⁴ The chemical forms and amounts of trace elements present in biological systems are responsible for their bioavailability, toxicity or functionality. For that reason, elemental biospeciation and structural determination studies are essential for the comprehension of the effects produced by metal-containing compounds in living organisms. The high complexity of Pt-based drugs metallomics studies arise from factors like the poor stability of the drugs and drug–biomolecule adducts,

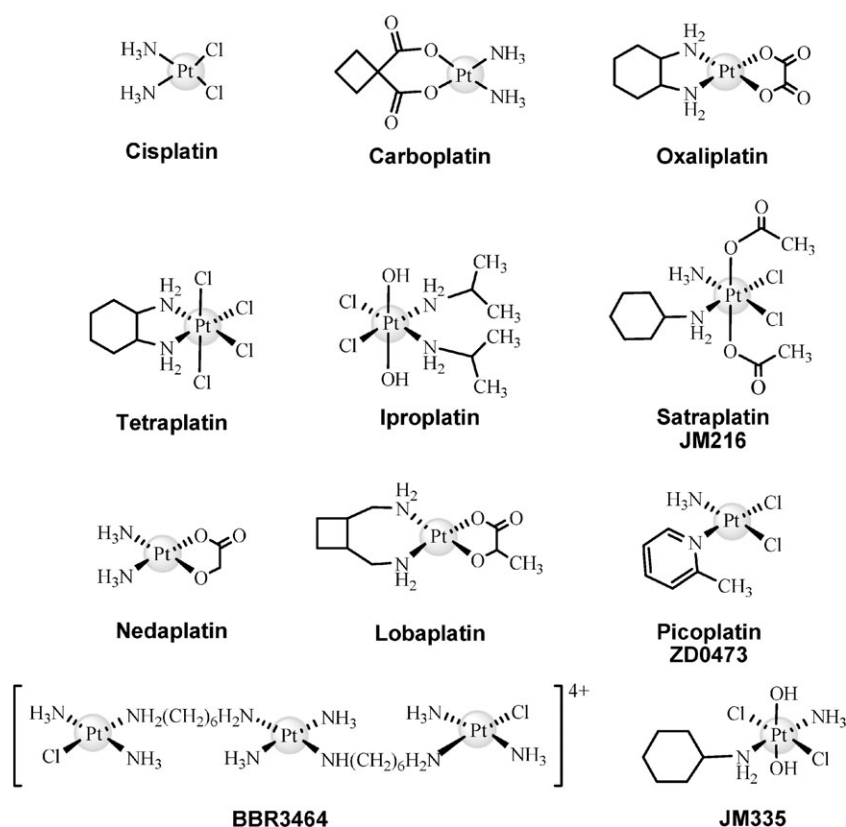


Fig. 1 Structures of the most important Pt-based drugs.

their low concentrations in real samples, the different complex sample matrices to be analysed and the high amount of potential biomolecule targets.^{25,26}

Pt(II), as a soft Lewis acid, presents a high affinity for soft bases with donor atoms. It shows a preferential binding to *S*-donor groups, but also other groups such as *N*-donors represent significant coordination points, being the affinity to the latter higher than for *O*-donors. Thus, aside from DNA, peptides and proteins with *S*- and *N*-containing aminoacidic residues are potentially reactive molecules towards Pt-drugs.²⁶ It has been suggested that on reaction with proteins, cisplatin may bind as a bidentate ligand, for instance, with one of the leaving groups replaced by a *S*-donor and the other by a neighbouring *N*- or *O*- donor. Since the SH → SS bonding is important for the protein conformation, the binding of Pt-drugs to cysteines may produce an alteration on the structure and the biological functions of proteins. This fact may be related to the side effects observed during the antitumor treatment.

When Pt-based drugs enter the blood stream, a series of interactions with blood components and later on with other molecules on cell membranes and inside the cells take place. The low chloride concentration in cytosols triggers the hydrolysis of cisplatin, producing a series of adducts as a result of the interaction of the evolved drug with cytoplasmic biomolecules. It is believed that some of these adducts are the key to understand the antitumor and toxic effects of Pt-drugs. The extent of the DNA-adducts formation may be limited by the interaction of the drug with cytosolic biomolecules like MT (metallothioneins) or GSH (glutathione), resulting in detoxification or resistance effects. Moreover, the binding of the drugs to blood proteins or the efficacy of the cell uptake could also alter the supply of the drug to the DNA. Other proposed resistance mechanism is related with the capacity of the cell to recognise and repair the damage produced by the drug–DNA adducts avoiding cell death.

The low concentration and the high diversity of drug–biomolecule adducts require the use of mass spectrometry analytical techniques, both elemental and molecular, coupled to different separation techniques, for the quantification and structural determination of Pt-adducts.²⁷ Depending on the objective, blood, urine, tissues or cell fractions must be analysed, using at least one high resolution separation technique.²⁸ Both analysis conditions and sample treatment, such as pre-concentration or clean-up steps, must ensure the preservation of the Pt-species identities. Nevertheless, the difficulty to analyse Pt-adducts at the trace levels present in real samples, preserving their identity along the several steps needed to separate and detect the adducts, has precluded, in general, *in vivo* experiments in bio-speciation. Alternatively, many of the reported articles consist in *in vitro* experiments that simplify the sample matrix and allow working with more concentrated species. The concordance between *in vitro* and *in vivo* experiments is usually a problem because slight differences in the reaction media and analyte concentration results in great differences in the identity and stability of the Pt-species. Results obtained from *in vitro* experiments must be carefully reviewed evaluating their reproducibility in biological living systems, being in any case a previous step to tackle the challenge of analysing real samples.

Not only speciation studies are important to evaluate the Pt-based drugs mechanism of action. Accumulation and distribution studies of the drug among different organs, tissues and cell compartments impose the use of cell fractionation techniques and cut-off filters to determine the affinity of the drug and to allow the identification of their main biological targets.²⁹ The use of samples from patients with different sort of tumours, ages, administration dosages, *etc.*, for *in vivo* experiments, have allowed to draw a distribution map of Pt-based drugs in organisms and are reported in a great number of works.^{29,30}

The information collected in this review will help the reader to clarify and sum up the reported data related with the speciation of Pt-containing drugs and the Pt adducts they form with biomolecules and also concerning the determination of total Pt content after the administration of the aforementioned drugs. The most commonly employed analytical tools are presented firstly, including sample preparation, separation and detection techniques. According to the sample matrix, the last section contains a complete summary of the most interesting reported analytical articles.

2. Analytical methodologies

In the last years there has been an extensive scientific activity in order to improve the identification and quantification of metal–biomolecule adducts using novel analytical methodologies. To fulfil this goal a combination of powerful separation techniques with detection techniques based mainly on mass spectrometry, the so called hyphenated techniques, have been employed.²⁸ Furthermore, important efforts have been directed towards the development of soft sample preparation methods in order to extract the target biomolecules without changing their original structures.

For several decades the determination of total Pt content in biological samples has been performed using analytical techniques like adsorptive stripping voltammetry (ASV), neutron activation analysis (NAA), or absorption and emission atomic spectroscopy, among others.^{30–34} Nowadays, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) seems to be the most powerful elemental technique because of its high sensitivity (reported limit of detection for Pt of 6 µg Kg^{−1} and 63 ng L^{−1} for tissues and cytosolic samples, respectively),³⁵ selectivity, lack of significant interferences for Pt determination in clinical samples and multielemental detection. Usually a simple acidic digestion in microwave oven (MO) reactors, followed by a direct flow injection analysis of the digested sample by ICP-MS, is enough to analyse the total content of Pt after fractionation of cellular extracts by ultracentrifugation or ultrafiltration through different cut-off filters.³⁵

Bio-speciation analysis involves highly complex analytical methodologies able to overcome important drawbacks like low concentrations, complex matrices, species transformations or cleavage of the metal–biomolecule bonds. Usually the complexity of biological samples makes necessary to perform several fractionation/separation steps for the isolation of the drug–biomolecule adducts by liquid chromatography³⁶ or electrophoretic techniques³⁷ prior to their determination. Apart from the previously referred procedures using ultracentrifugation

and/or ultrafiltration, precipitation of the thermally labile proteins by heating at 55 °C is commonly used.³⁸ Even Size Exclusion Chromatography (SEC) may be considered as a desalting and pre-fractionation technique due to its high protein recovery. SEC, Ion Exchange (IXC) or Reverse Phase (RPC), are the chromatographic separation methods most frequently used. Electrophoretic techniques have also been used for the separation of drug–biomolecule adducts.³⁷ 2D-SDS-PAGE (Two Dimensional Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) allows high resolution separations for proteins, although it can not be coupled on-line to detectors. Moreover, denaturing conditions, used in 2D-SDS-PAGE experiments, may affect certain metal–biomolecule bonds. Capillary Electrophoresis (CE) has also been employed in metallomics studies.³⁹ The advantages of this high resolution separation technique are the compatibility with ICP-MS and ESI-MS detection, the simplicity and the short analysis times needed.

Structural information is necessary for the final identification of metal–biomolecule adducts. Traditionally, molecular mass spectrometry has been used, not only for proteomics but also for metallomics studies, where the identification of the biomolecule and its structure is also necessary. The development of “soft” ionisation sources such as matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) and electrospray ionisation (ESI) represents a great advance in mass spectrometry for proteins, peptides and other biomolecule studies. These ionisation sources are able to ionise and turn large molecules into gas phase with a minimal change in their integrity. Their coupling to time of flight (TOF), ion trap (IT), triple quadrupole (TQ) and more recently, Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) or Orbitrap mass spectrometry analysers, have allowed to obtain fast and sensitive mass spectra for identification purposes. This great variety of mass spectrometry techniques together with the possibility to combine analysers in *tandem* instruments, offer different and even complementary ways to identify unknown biomolecules. In metallomics studies, ESI seems to be more suitable than MALDI because the softer ionisation process it involves helps to preserve the integrity of the metal–biomolecule bond. Moreover, ESI-MS can be coupled to different separation techniques more easily than MALDI-MS.

Since the mid 90's, peptide mass fingerprinting (PMF) or *de novo* sequencing from peptide fragmentation spectra, have been the most applied procedures for protein identification, constituting the so-called “classical proteomics”.⁴⁰ However, current demands for high throughput protein identification, quantitative determinations in differential protein expression or characterising post-translational modifications, have promoted a “Second Generation Proteomics”. Some examples of these new methodologies are the MudPIT analysis (Multidimensional Chromatography Protein Identification Technology) or the quantification approaches by isotope labelling.

The use of elemental mass spectrometry techniques like ICP-MS in biomolecule analysis, can also contribute to the advances in that new generation proteomics. The need of more sensitive determinations and quantitative results makes ICP-MS highly suitable for metallomics studies. ICP-MS

provides multielemental information on metals, metalloids and some important non-metals such as halogens, sulfur or phosphorus. The high energy ionisation source produces species- or compound-independent signals, making possible the absolute quantification of biomolecules containing detectable elements. The high sensitivity and the wide concentration linear range of the ICP-MS allow tackling the simultaneous quantification of both low and high abundance biomolecules, as well as discriminating between very close expression levels of proteins. Therefore, ICP-MS is excellent for quantification tasks⁴¹ as well as for following the target species during an interaction process or a separation experiment.⁴² Besides, the multi-isotopic capability of the technique allows performing isotopic dilution analysis (IDA). In the last years it has been pointed out that the combined use of elemental and molecular hyphenated techniques²⁷ is the key to a real improvement in metallomics analysis.

The low concentration level of the metal–biomolecule adducts in most samples, and the lower sensitivity of molecular mass spectrometry detectors compared with ICP-MS, make necessary the use of preconcentration procedures such as solvent evaporation, freeze-drying, ultrafiltration or column-head focusing prior to high resolution chromatographic separations.⁴³ On-line focusing can be carried out by IEC and RPC, achieving high preconcentration levels with low sample manipulation. Sometimes concentrated chromatographic fractions may present a high saline content that is incompatible with structural mass spectrometry techniques such as ESI-MS or MALDI-MS. Therefore, a previous desalting step is usually performed by SEC, dialysis, cut-off filters, or micro-SPE cartridges.⁴⁴

Each of the described procedures should keep the integrity of the original metal–biomolecule adducts. For this reason, the use of protease inhibitors or the careful control of experimental conditions like pH, temperature, salinity or storage time, are mandatory to avoid bond cleavage, species transformation and protein denaturing or aggregation.²⁸

The characterisation of drug–protein adducts may be undertaken by either bottom-up or top-down mass spectrometry based approaches. Both methodologies have already been performed^{45,46} resulting in the elucidation of the Pt binding sites within several proteins. In fact, there is a significant research activity in an attempt to establish the suitability of each methodology for the full characterisation of Pt adducts in real samples, keeping in mind the need to preserve the drug–protein binding along the whole process. Whenever results are attainable using a bottom-up strategy, it is the method of choice, avoiding the interpretation of the highly complex mass spectra generated by top-down methodologies. Moreover, in a bottom-up approach the characteristic isotopic distribution of platinum can be useful for finding peptides bound to Pt because it modifies the typical isotopic pattern of a peptide, this being clearly detectable by mass spectrometry. Therefore, the recognition of Pt-containing peptides resulting from protein digests facilitates the identification of the platinated proteins from which they derive and their Pt binding sites. This is not the case of whole large proteins involved in top-down approaches because the contribution of this element to their isotopic pattern is less significant.

On the other hand, the accurate mass measurement of FT-ICR analysers and the fragmentation of isolated intact proteins are outstandingly contributing to improve top-down applications. However, the lack of high resolution separation techniques for proteins that can be easily coupled to mass spectrometry detectors, the signal suppression effects in ESI sources and the not well-controlled fragmentation mechanisms inside the ICR cell, are fundamental drawbacks of the top-down approaches. Still, top-down experiments allow studying post-translational modifications, site-specific mutations and minimise the alteration of the binding of Pt-containing drugs to biomolecules.

3. Pt-based drug interactions

3.1 Stability in aqueous media

In their way to the therapeutic targets, changes in the original chemical form of the administered drugs are often produced. Physiological aqueous medium leads to hydrolysed forms of the Pt-drugs, which may react to a different extent with blood components or cell biomolecules. These transformations increase the reactivity of the drug and have an influence on their accumulation, excretion and on their toxic or antitumor effects. However, the formation of the active hydrolysis products is time-dependent and thus the reactivity of the drug follows the hydrolysis kinetics.

The hydrolysed forms of cisplatin, as shown in Fig. 2, are well known since several decades.^{25,47–51} However, the challenge is their detection in physiological media at therapeutic

levels. Andersson *et al.*^{52,53} detected and separated cisplatin and the mono aqua derivate in plasma and blood samples^{53,54} by HPLC (combining Strong Cation Exchange (SCX) and Strong Anion Exchange (SAX) mechanisms in a coupled column system) with post-column derivatisation with DDTC and UV detection. The detection of these two cisplatin chemical forms in the same type of samples was also reported using a more sensitive method based on anion-exchange chromatography and off-line detection by GFAAS.³³ Other cisplatin derivatives like the dimer and the diaqua species were studied by RP-HPLC coupled to UV or ICP-MS detectors in aqueous solutions of the drug.⁵⁵ As in other reported articles,⁴⁹ there is no evidence on the presence of the latter species in aqueous solution at room temperature, and it could only be obtained by removing the chlorides from the solution (with AgNO₃ for instance). All the studies agree on the fast evolution of cisplatin to the mono aqua form in water, being inhibited by the addition of NaCl.⁵⁶ Using RP-HPLC-ESI-MS, Cui and Mester⁵⁷ demonstrated that at basic pH the excess of OH[−] displaces the chloride ions, promoting the formation of the dihydroxo derivative, while at acid pH only the mono aqua is produced. However, when performing *in vitro* or *in vivo* experiments, only physiological pH must be considered. The formation of the dimers is discarded in clinical samples.

Looking for more sensitive methodologies, HPLC-ICP-MS experiments have achieved excellent detection limits (between 0.09 and 0.15 µg L^{−1}) from biological and environmental samples⁵⁸ for cisplatin and the two main hydrolysed derivatives, as well as for carboplatin and oxaliplatin. Other authors have reported detection limits of 0.7 µg L^{−1} for cisplatin by

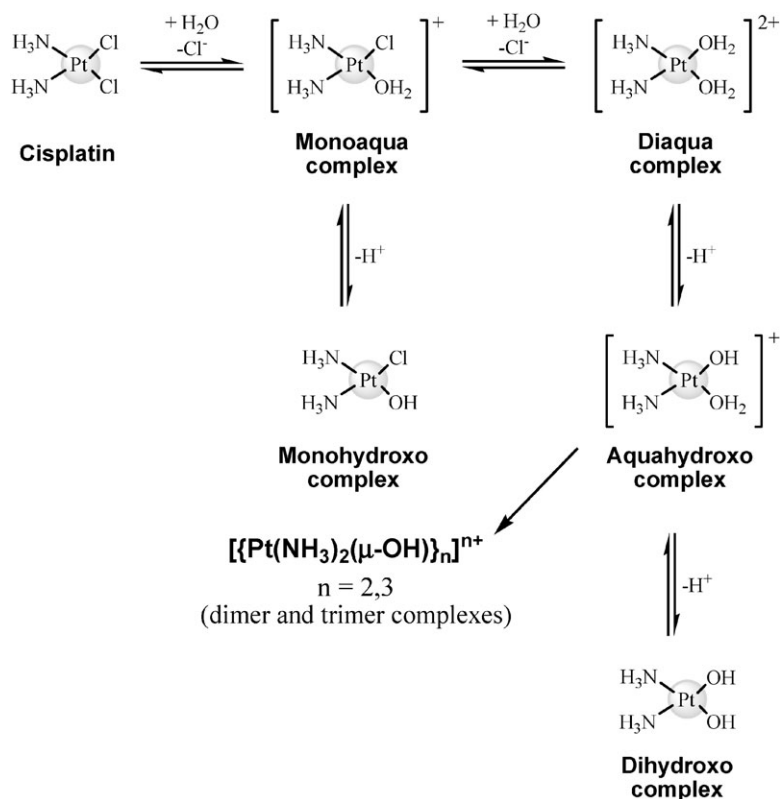


Fig. 2 Hydrolysis of cisplatin.

high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (ESI-FAIMS-IT-MS).⁵⁹ This mass spectrometry technique allows detecting and quantifying the intact drug and its most important hydrolysed forms without any previous separation technique.

The interaction between cisplatin and the chromatographic mobile phase solvents and modifiers has been reported. Some interesting works by El-Khateeb *et al.*⁶⁰ using RP-HPLC-UV and NMR conclude that MeOH is a better choice as mobile phase for HPLC than ACN, due to its lower interaction with the drug. The use of trifluoromethanesulfonic acid to adjust the mobile phase pH is recommended instead of carboxylic acids, and it is also reported that SDS does not interact with any of the drug forms. Other authors have evaluated the possibility to use formic or phosphoric acid as reagents for the mobile phase,⁵⁵ being the later highly reactive with cisplatin and its derivatives.

Carboplatin was designed with the aim of keeping the antitumoral properties of cisplatin and reducing its toxicity with the incorporation of more stable leaving groups. The result was a less toxic drug for the gastrointestinal tract, less neurotoxic and lacking of nephrotoxicity, being myelosuppression the dosage limiting factor. The same amount of carboplatin produces less DNA–Pt adducts than cisplatin with a slower formation rate.⁶¹ Nevertheless, when used at their appropriate dosage, which is higher for carboplatin than for cisplatin, the clinical efficacy is similar for both drugs.⁶² A low percentage of the intact carboplatin evolves to the hydrolysed forms in biological media because of the high stability of the drug in aqueous or saline solution.⁵⁸ Up to eight minor hydrolysis products of carboplatin derivatives have been detected by RP-HPLC-UV and three of those species have been identified by ESI-MS.⁶³ Other authors have also detected the dimer by RP-HPLC-UV-ESI-MS.⁶⁴

Unlike cisplatin, oxaliplatin is less stable on growing the chloride concentration. Oxaliplatin undergoes a spontaneous transformation in aqueous biological media, being Pt (DACH)Cl₂ its main product.⁶⁵ The oxalate group can be shifted by nucleophile groups as Cl[−] or HCO₃[−] and either by H₂O. Some of the hydrolysed or chloride structures of oxaliplatin, which may be found in urine and blood, are described in the literature^{66,67} and shown in Fig. 3.

3.2 Interaction of Pt-based drugs with blood biomolecules

Since intravenous injection is the usual way to administer Pt-containing drugs, their interaction with blood biomolecules will determine aspects like toxicity, antitumor efficiency, transport, accumulation and excretion.⁶⁸

Cisplatin interacts to a high extent with blood biomolecules⁶⁹ remaining free only about 20% of the drug 24 h after its administration.⁷⁰ This fact and the high saline content of blood prevent cisplatin from significantly evolving to the mono-aqua form.^{53,54} Furthermore, the low amount of mono-aqua derivative found in blood comes from the originally administered drug itself. The analysis of blood from patients, treated with cisplatin between 5 and 17 years before, showed levels of Pt which were between 2 and 3 orders of magnitude higher than basal.⁷¹ Such persistence is in agreement with the statement by some authors that the drug–protein adducts formed in blood act as an storage for the drug.⁷²

The low reactivity of carboplatin with blood biomolecules explains the lack of works describing this interaction. A great amount of the drug is excreted intact and some authors have reported that about 60% of the drug incubated with rat ultrafiltrated plasma is recovered intact.⁷³ Even so, carboplatin adducts with proteins having molecular weights similar to HSA and γ -globulin were recently detected by SEC-ICP-MS.⁷⁴

When oxaliplatin enters the blood stream, its oxalate group is lost, resulting in new and highly reactive species of the drug. The intensive interaction of oxaliplatin with blood biomolecules⁶⁶ explains that after 5 h of incubation, between 85 and 88% of the drug is bound to blood plasma biomolecules.⁷⁵ *In vivo* experiments confirm this trend, showing that up to 95%⁷⁶ and 98%⁷⁷ of the detected drug are bound to blood biomolecules after 5 and 21 days from the administration, respectively. The irreversibility of the oxaliplatin bond with red cells⁷⁵ and the lack of Pt flow from erythrocytes⁷⁶ seem to indicate that blood does not work as an active drug-delivering system.

SEC-ICP-MS analysis of ultrafiltrated plasma from patients treated with oxaliplatin shows that about 40% of the Pt elutes in the range of 160–200 KDa, 40% around 60 KDa and 15% over 2 KDa, which are equal to the Mr for γ -globulin, HSA and adducts of the drug with low Mr molecules, respectively.⁷⁸

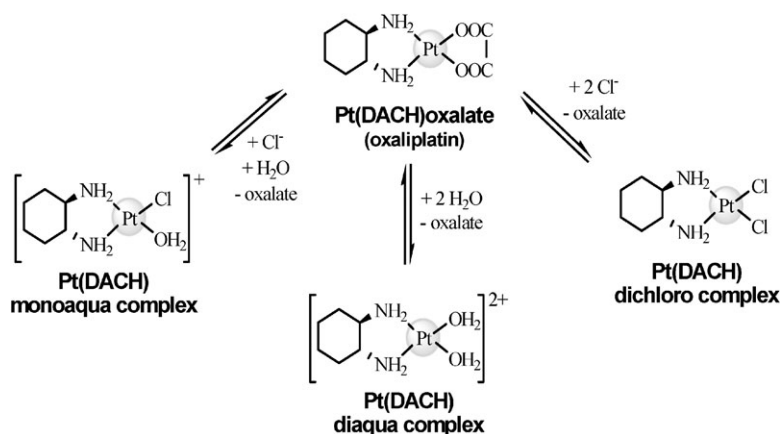


Fig. 3 Hydrolysis of oxaliplatin.

Among blood proteins, transferrin (Tf), albumin (HSA) and hemoglobin (Hb) are important biomolecules that play indispensable roles related, for instance, with the transport of essential substances. The interaction of Pt-based drugs with these proteins has been studied in depth for decades.

3.2.1 Interaction with HSA. HSA has a high affinity and capacity for Pt-based drugs,⁷⁹ binding up to 10 mol of Pt-drug derivative per mol of HSA after incubation for 50 h at 20-fold excess of cisplatin.⁸⁰ It has been proposed that the drug–HSA interaction follows a pseudo-first order kinetics with a rate constant of $5.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.⁸⁰ Furthermore, cisplatin and oxaliplatin showed by CE-UV⁸¹ similar binding constants and stoichiometries in their interaction with HSA and Tf.

The high stoichiometries of the Pt-drug–HSA adducts observed cannot be explained by the only free cysteine group present in the protein (Cys 34). Experiments using bovine serum albumin (BSA) demonstrated the cleavage of disulfide bonds as a result of their interaction with cisplatin^{82,83} and transplatin.⁸⁴ This was probably followed by an intramolecular interaction and the consequent modification of the secondary structure and the biological functions of the protein. Even considering Cys 34 and the disulfide bonds cleavage, additional binding sites must be involved. Indeed, methionines, histidines or even tyrosines have also been suggested as reactive groups towards cisplatin.^{72,85,86} In that way, a very recent work based on multidimensional protein identification technology (MudPIT) methodology describes precisely some binding sites for the Cisplatin–HSA interaction,⁸⁷ including cysteine residue Cys 34, two methionine sites (Met 329 and Met 548) and the tyrosine and aspartate *O*-donor sites Tyr 150 and Asp 375.

Slight alterations in the bond environment or secondary structure modifications can produce conformational changes in the α -helix structure (intact HSA has a 67% of α -helix). One way to detect this conformational change is to measure the quenching of fluorescence of Trp.⁸³ Depending on the drug:protein molar ratio, the fluorescence response can

decrease between 30 and 75%. Other techniques like circular dichroism (CD),⁸⁸ UV spectroscopy⁸³ or FTIR, verify changes in the α -helix structure that range between 15 and 45%. Disulfide bond cleavages were also observed in cisplatin– γ -globulin interactions.

Cisplatin may also lead to HSA dimerisation. SEC-UV experiments⁸⁶ allowed detecting Pt-species of around 140 KDa and probably the disulfide bond cleavages could be related with this aggregation process. Similar results were reported by Einhäuser *et al.*,⁶⁹ not finding Pt-species in molecular weight fractions lower than 100 KDa. The interaction of cisplatin with HSA may produce additional effects like a change in the affinity for other ligands. For instance, the affinity of HSA towards *heme* group is strongly reduced by the presence of the drug bound to HSA.⁸⁹

Finally, it should be mentioned that carboplatin seems to enhance its chemotherapeutic action when it interacts with HSA.⁹⁰ This conclusion was extracted from experiments where a greater accumulation of the drug was observed in several organs after a combined administration of the drug and a significant amount of HSA, suggesting a possible role in the transport and delivery of Pt drugs by albumin.

3.2.2 Interaction with Tf. Transferrin does not interact to a high extent with Pt-based drugs.⁸¹ Although a preferential site appears, more than one cisplatin molecule can interact with Tf.⁹¹ ESI-MS analysis assisted by modelling studies shows the interaction of the hydrolysed form of cisplatin with hydroxyl functional groups from Thr 457.⁹² Other experiments based on NMR analysis show that only Met 256 and Met 499 result modified during the interaction of cisplatin with Tf.^{93,94} Under experimental conditions closer to real conditions, in terms of pH, salinity, molar ratio or incubation time, it has been detected by ESI-Q-TOF that, mainly, one molecule of the mono-aqua derivative of cisplatin interacts with apo-Tf³⁵ (Fig. 4).

Additionally, bottom-up experiments, combining RP-ICP-MS and RP-ESI-Q-TOF have shown the presence of Pt in peptides

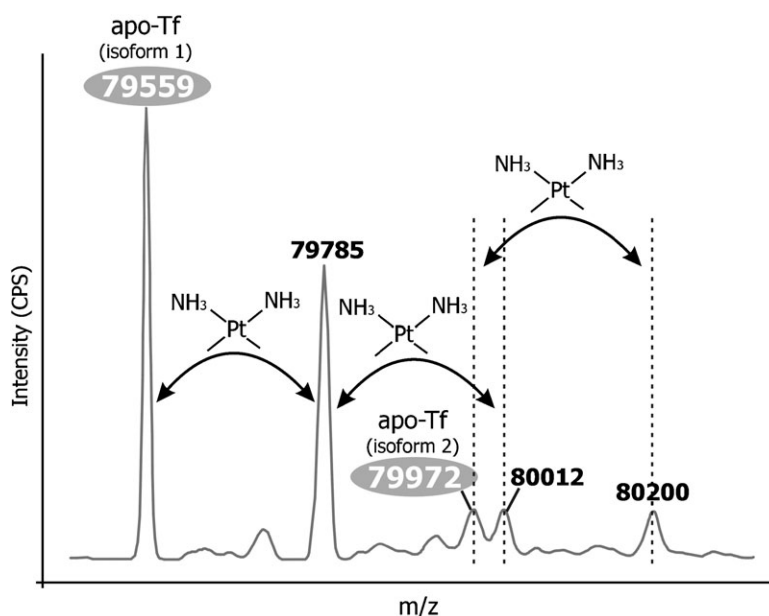


Fig. 4 ESI-Q-TOF deconvoluted spectra of apo-Tf incubated with cisplatin simulating physiological conditions.

by comparing the isotopic pattern of the detected Pt-peptides with the theoretically expected isotopic pattern. The successful application of tryptic digestions to analyse Pt-adducts could lead to new approaches in Pt-containing drug metallomics, avoiding the highly complex analysis of intact macromolecules. This strategy requires a high strength of the drug–Tf bond to ensure that the detected Pt-species come from the original adduct.⁴⁵ Other successful application of the bottom-up strategy to study Pt-binding proteins has been performed by Will *et al.*⁸⁷ Some cisplatin–Tf binding sites as Met 256 or O-donor sites as Glu 265, Tyr 314, Glu 385 and Thr 457 were proposed using 2D-LC-ESI-MS.

The interaction of cisplatin with iron-saturated apo-Tf is not influenced by the presence of the metal. Moreover, iron is not displaced by cisplatin, indicating different binding sites for cisplatin and iron, being the results for apo-Tf and holo-Tf comparable.³⁵

Several authors have compared the cytotoxic behaviour of free cisplatin with that of cisplatin bound to Tf.⁹⁵ These *in vitro* experiments with human epidermis cancer cells show that the cisplatin–Tf adduct decreases the drug cytotoxicity.

Oxaliplatin interaction with holo-Tf has also been studied.⁹⁶ HPLC-ICP-MS and nanoESI-Q-TOF analyses lead to the conclusion that the formed adduct may consist on an intact molecule of oxaliplatin bound to the protein.

3.2.3 Interaction with Hb. The reactivity order of the Pt-based drugs with Hb follows the sequence: oxaliplatin, cisplatin and carboplatin.⁹⁷ For each drug, at least three Pt-containing species have been detected by SEC-ICP-MS from *in vitro* experiments in human blood. For all the tested drugs, only one of the three chromatographic peaks showed Pt and Fe, probably corresponding to the intact Hb bound to the drug. The detection of m/z 616.5 in the fractions with molecular weight lower than 3000 Da by nanoESI-MS confirmed the loss of the *heme* group when Hb is incubated with each of the three studied Pt-containing drugs. Moreover, the amount of Fe in this small molecular mass fraction increases with the drug concentration. This information is relevant in order to evaluate the decrease in the capacity of Hb to transport oxygen.

Regarding the reactive chemical form of the Pt-based drug, Mandal *et al.*⁹⁸ proposed for cisplatin that $(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2)^{2+}$ is the residue bound to the Hb. An increase in the cisplatin concentration and temperature enhances the adduct formation and the *heme* group loss. Clinical concentrations of about $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ of cisplatin are enough to obtain the cisplatin–Hb adduct.⁹⁹

Recent works in the study of the oxaliplatin–Hb adducts identified the forms $[(\alpha\text{h}\beta\text{h})_2\text{-oxaliplatin}]$ and $[(\alpha\text{h}\beta\text{h})_2\text{-Pt-DACH}]$ by nanoESI-Q-TOF.¹⁰⁰

3.3 Pt-based drugs excretion

Urine is used to follow the time course of Pt excretion after the drugs administration and to evaluate their biological half-time. Begerow *et al.*¹⁰¹ obtained basal levels of Pt in urine within the range $0.48\text{--}7.65 \text{ ng L}^{-1}$ employing the high sensitivity technique double focusing (DF)-ICP-MS. These low basal levels allow the detection of changes in the Pt

content in urine. In this way, concentrations of 180 ng L^{-1} of Pt were detected by voltammetry in patients treated 17 years earlier with cisplatin.⁷¹ The chemical species and the levels of the excreted drug are related with its reactivity and toxicity. The fact that carboplatin is excreted faster is in accordance with its low reactivity.

The comparison of the excretion data available is complicated because of the variety of treatments and dosages used. Some studies reported that, after a single injection or prolonged injection treatments of 40 to 140 mg m^{-2} , between 10 and 40% of cisplatin is excreted in the urine during the first 24 h .¹⁰² After 5 days of prolonged treatment with dosages between 40 and 100 mg m^{-2} , $35\text{--}51\%$ of the administered Pt has been excreted. Despite being found in bile or in the large intestine, Pt excretion by faeces is not significant.

Pt-species in human urine have been separated and identified by RP-HPLC-ICP-MS, ^1H and ^{13}C NMR and FAB-MS¹⁰³ after the administration of 50 mg m^{-2} . Intact cisplatin, the monoaqua derivative, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{Creatinine})]^+$ complex, cisplatin–urea and cisplatin–uric acid adducts were detected just after the administration, being the Pt concentration measured of $30\text{--}50 \text{ mg L}^{-1}$. Three weeks later, between 50 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of Pt were found in urine and transformations in all the initially detected Pt-species were also observed. The same Pt-species were detected in urine from rats with induced diabetes, despite the fact that diabetic rats are resistant to cisplatin nephrotoxicity.¹⁰⁴

Urine has also been proposed as the main excretion route for carboplatin.¹⁰⁵ Between 50 and 70% of the drug is excreted 6 h after the treatment, in a process that is faster than for cisplatin. Besides, about 32% of the drug remains intact in urine. Three weeks later, high concentrations of Pt are measured in urine, but carboplatin undergoes biotransformation processes to Pt-biospecies different from the original form. *In vivo* transformation of carboplatin to cisplatin¹⁰⁶ is supported by HPLC-ICP-MS studies where a co-elution of cisplatin and its monoaqua derivative with some Pt-species formed from carboplatin is observed.

The high reactivity of oxaliplatin is shown both in the excretion rate of the drug and in the amount of Pt-species found in urine.⁶⁸ After 5 days from the administration of single dosages of 130 mg m^{-2} , about 54% of the administered drug was excreted by urine and only 2% by faeces.¹⁰⁷ Similar results have been reported elsewhere.^{77,108} Up to 16 Pt-species have been found in urine from *in vitro* experiments.¹⁰⁹ The use of mass spectrometry techniques allowed the identification of Pt(DACH) bound to dicreatinine (24%), methionine (6%), monochloro (2%), monochlorocreatinine (14%), dichloro (7%) monocreatinine (11%) and the complex $\text{Pt}(\text{DACH})(\text{H}_2\text{O})_2$. Parallel *in vivo* experiments showed similar results: Pt (DACH) bound to dicreatinine ($1\text{--}4\%$), methionine ($1\text{--}7\%$), monochloro (2%), monochlorocreatinine ($1\text{--}20\%$) and monocreatinine ($1\text{--}10\%$). Pt (DACH)-glutathione ($2\text{--}18\%$) was also identified, confirming the possible detoxification role of the intracellular glutathione.

3.4 Accumulation and distribution in tissues of Pt-based drugs

The chemical form of the drug when administered, the design of the administration procedure and the use of protective

agents have influence in the final behaviour of the drug. For instance, low concentration dosages, waiting several weeks between injections, minimise the accumulation of Pt in organs.³⁴ A slow administration of each of the dosages is also beneficial for the patient.¹¹⁰ Other common practices are the previous hydration of the patient, the administration of low amounts of NaCl or NH₄Cl to prevent cisplatin nephrotoxicity,¹¹¹ or the use of sodium thiosulfate to avoid ototoxicity.¹¹² Other way to prevent toxicities is the use of protective or rescue agents which produce easily excretable Pt complexes.¹¹³

Prior to the speciation analyses, accumulation studies are basic to know the distribution and affinity of the Pt-based drugs in the organism. For several decades, studies measuring the Pt content in different target organs have been reported. Human tissues from patients with different tumours and subjected to different treatments based on cisplatin were analysed by X-Ray Fluorescence. Liver, kidney and prostate were the organs with the highest Pt levels. Lower concentrations were found in bladder, muscle, testicles, pancreas and spleen, being the lowest concentrations detected in bowel, adrenal gland, heart, lung, brain and cerebellum.¹¹⁴ Similar works, performed by NAA, point out liver, kidney and testicles as the organs that accumulate cisplatin the most.³⁰ The gamma camera spectroscopy employed by Areberg *et al.*¹¹⁵ is an interesting contribution to visualise the cisplatin accumulation and distribution. Recent studies carried out by ICP-MS agree with the preferential Pt accumulation in kidney and liver from rats treated with cisplatin, carboplatin and oxaliplatin.³⁵ Although the accumulation pattern in the studied organs is similar for the three drugs, oxaliplatin relative accumulation is higher than for cisplatin and both greater than for carboplatin. The analysis of inner ear and kidney tissues, both toxicologically affected by Pt drugs^{116,117} revealed that for inner ear, the accumulation of cisplatin was higher than that for oxaliplatin or carboplatin, while in kidney, oxaliplatin accumulation was the highest observed. These results suggest that the key factor in toxicity may be the drug structure itself rather than the total Pt content in the organ. Furthermore, a ten-fold higher accumulation of Pt in the cochlea than in brain was found, being the elimination rate of Pt higher in cerebral tissue.

The ratio of Pt in blood plasma *versus* Pt in rat tissues is similar during the treatment with cisplatin and carboplatin.²⁹ About 4% of the administered Pt was accumulated in rats after 3 months and 5% in pigs and humans after 11 months.¹¹⁸

Tissue fractions and sub-fractions from rats treated with cisplatin, carboplatin and oxaliplatin have also been analysed.³⁵ The distribution of Pt among the nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions was evaluated and a fractionation study among cytosolic biomolecules was performed. Although the three drugs present different accumulation rates in the organs tested, once they are within the cell, the three drugs show a similar distribution. The cytosolic fraction and especially a low molecular weight sub-fraction were attractive samples for speciation studies due to their significant Pt content, 47–63% in the cytosol and 20–30% in the fraction with molecular weight lower than 50 kDa.

3.5 Interaction of Pt-based drugs within the cell

Cisplatin, carboplatin and oxaliplatin enter the cell as neutral molecules, mainly in a passive diffusion process,⁴³ but some authors have proposed a mixed mechanism.¹¹⁹ In this sense, protein-mediated transport systems, such as the copper transporter Ctr1^{120–122} have been proposed. However, despite some biological and biochemical evidences supporting this latter hypothesis, it is still unclear how exactly the entrance process occurs. In this regard, some approaches have been made for the identification of protein targets in a whole cellular system, where membrane proteins were found in the electrophoretic band with the highest Pt content.³⁷ Although a preferential interaction between cisplatin and membrane proteins with respect to phospholipids has been described,¹²³ the weak and reversible binding of the drug to the latter seems to result in structural changes within the membrane, causing alterations in properties such as permeability.¹²⁴

3.5.1 Interaction with DNA. Inside the cells, the low chloride concentration in the cytoplasm (approx. 5 mM) triggers cisplatin hydrolysis, generating aqua-complexes, which are more reactive than the drug due to the fact that H₂O is a better leaving group than Cl[−].¹²⁵ The monoaqua complex has proven to be the most cytotoxic species of the two cisplatin aqua-derivatives. As it is summarised in Fig. 5, DNA is, above other biomolecules, the main target of these complexes. The mechanistic pathway by which Pt-based drugs act as potent chemotherapeutic agents involves the formation of adducts with DNA nucleobases, as was first demonstrated by J.J. Roberts in 1972.¹²⁶ Some works have already been published pointing out DNA–Pt adducts as responsible for exerting the cytotoxicity.^{127–129} These covalent interactions result in crosslinks between adjacent nucleobases which distort the geometry of the DNA molecule. Important biological processes such as cell division, DNA transcription and replication, and protein synthesis are thought to be inhibited as a result of the adducts formation.¹³⁰ Recently S.J. Lippard has reviewed these points and their influence on the inhibition of transcription.¹⁴ The preferred binding site of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin is guanine N7 and, to a lesser extent, adenine N7, although platination may also occur at cytosine N3 and adenine N1.^{68,131} This can probably be ascribed to the high nucleophilicity of the imidazole ring within the purine system. *In vitro* studies show that the majority (≈60–65%) of the adducts formed are intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases 1,2-d(GpG).^{131–133} Intra-strand crosslinks between neighbouring AG adducts, 1,2-d(ApG) are the next most abundant species formed (≈25–30%).¹³⁴ Other minor adducts include intra-strand crosslinks between non-adjacent guanine bases, 1,3-d(GpNpG), as well as inter-strand crosslinks, monofunctional adducts, including protein–DNA crosslinks, which make up the remaining percentage of species produced.^{133,135} Fig. 6 summarises the interaction of cisplatin with DNA. The cytotoxic efficacy of each of the different types of DNA adducts is as yet under study, however, it is thought that above all, 1,2-d(GpG) intrastrand adducts are the main responsible for cisplatin antitumoral activity.¹⁴ Intra-strand crosslink levels in tumour

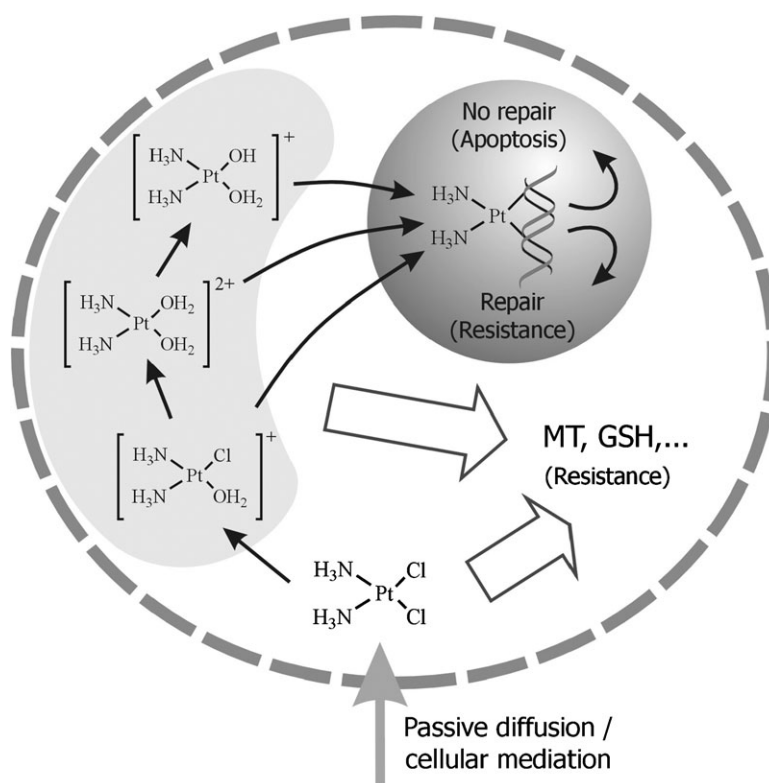


Fig. 5 Scheme of the entrance and interactions of cisplatin in the cell.

biopsies taken from patients treated with cisplatin have been reported to be approximately 1 per 100 000 and 1 per 300 000 bases for 1,2-d(GpG) and 1,2-d(ApG), respectively.¹³⁶ Oxaliplatin and carboplatin produced in cells fewer DNA–Pt adducts compared to those formed by cisplatin.^{133,137} However, less DNA lesions are needed for cell growth inhibition when either, oxali- or carboplatin are used instead of cisplatin.¹³⁷

The formation of DNA–drug adducts is a pharmacokinetic parameter to optimise in cancer therapy. Therefore, the quantification of DNA–drug adducts is of paramount importance. These adducts are indicators of the exposure to the drug, but they cannot be taken as direct and definitive proofs of genotoxic damage. In fact, a major clinical limitation for the use of cisplatin is the intrinsic or acquired resistance to the drug, mainly due to an increased level of repair of DNA–cisplatin adducts. There is a need for specific chemical methods to selectively detect those adducts formed *in vivo* at pharmacological concentrations.

The techniques traditionally used to study the interaction of these drugs with nucleobases have been, predominantly, X-ray crystallography,¹³⁸ NMR¹³⁹ and immunoassay.¹³³ However, they present serious disadvantages, namely that crystals of a suitable quality are required for crystallography, that a relatively high quantity of high-purity sample is required for NMR and that by using immunoassay techniques it is not possible to discern between different types of adducts. Tests used to evaluate Pt-drugs genotoxicity include those directed to study changes in DNA integrity such as the Comet assay, TUNEL methods, the number of micronuclei (MNI)¹⁴⁰ and ³²P post-labelling. The widely used Comet assay cannot differentiate among the many different types of DNA damage.

Although ³²P post-labelling provides excellent detection limits (it is possible to detect 1 adduct in 10¹⁰ nucleotides), it is a complex assay (including radioactive phosphorus) and is not specific for cisplatin adducts.¹⁴¹

The highly sensitive and selective sector field ICP-MS technique was coupled to ion exchange chromatography and UV detector (HPLC-UV-SF-ICP-MS) for the investigation of the time-dependent reaction course of the cisplatin–5' guanosine monophosphate (5'-GMP).¹⁴² Measuring the molar ratios of P and Pt provides direct stoichiometric information and facilitates the chromatographic identification of the major *cis*-[Pt(NH₃)₂(GMP)₂]²⁻ adduct. Parallel studies about binding kinetics, the nature of the adducts formed and the location of the binding site within the specifically designed double-stranded DNA oligonucleotides were carried out with the highly sensitive and selective Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT-ICR-MS)¹⁴³ technique. It was demonstrated that binding to DNA takes places *via* a [Pt(NH₃)₂Cl]⁺ intermediate prior to the formation of bifunctional [Pt(NH₃)₂]²⁺ adducts.

D. Garcia *et al.*¹⁴⁴ performed *in vitro* incubations of individual DNA nucleotides with cisplatin. The cisplatin–nucleotide adducts (containing both Pt and P) were separated in a narrow-bore C₈ column from the unreacted nucleotides (containing P but not Pt), and monitored by HPLC-ICP-MS. Incubations of cisplatin with either, a commercial oligonucleotide (dGMP) or *Calf thymus* DNA samples, followed by enzymatic hydrolysis, were prepared to ascertain the quantitative capabilities of this procedure. The successful quantitative analysis of the formed adduct: [Pt(NH₃)₂(dGMP)₂] confirmed the suitability of the method. Structural characterisation of the

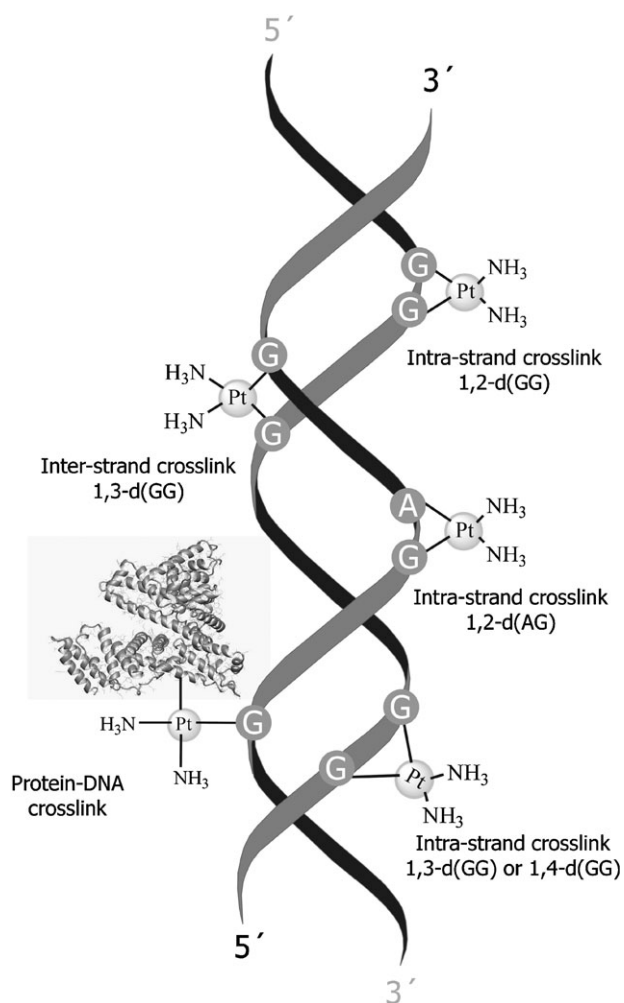


Fig. 6 Interaction of cisplatin with DNA nucleobases.

complex formed was performed by ESI-Q-TOF. These authors¹⁴⁵ also proposed a sensitive and selective method by capHPLC-ICP-MS for the determination of 1,2-d(GpG) intra-strand cisplatin–DNA adducts. Somatic cells of *Drosophila Melanogaster* flies were exposed to cisplatin at biologically relevant concentrations of 0.5 and 1 mM (inducing damage but not death) and reaction products were cleaved by enzymatic hydrolysis of the DNA samples. These studies showed a direct correlation between the concentrations of cisplatin adducts, the induced genotoxic damage (measured as DNA strand breaks by Comet assay) and the cisplatin concentration in flies whose response to DNA damage is known to be equivalent to that of mammals.

The amount of DNA–oxaliplatin adducts formation in white blood cells of patients with metastatic colorectal cancer was evaluated by Weber *et al.*¹⁴⁶ using adsorptive stripping voltammetry (ASV). DNA was isolated by gradient density centrifugation and a four step solid phase extraction procedure and quantified by UV spectroscopy. Pt was determined after mineralisation of the DNA sample by ASV (formazone method). It was possible to determine Pt:nucleotide ratios in these samples down to five Pt atoms in 10^8 nucleotides. With this method the time-dependent formation of oxaliplatin–DNA adducts can be monitored in clinical studies, which may help

to understand inter-individual differences in the responses of patients to oxaliplatin-based therapy.

Using a linear ion trap ESI-MS, Kerr *et al.*¹⁴⁷ demonstrated the formation of adducts between oxaliplatin and each of the DNA nucleobases in solutions containing them either individually or in mixtures. When the drug was incubated with the four bases together at close to equal molar concentrations, adducts containing predominantly adenine and guanine were found, cytosine adducts were formed to a lesser extent, whilst the yield of thymine adducts was minimal. A large excess of drug was required to ensure the formation of cytosine and thymine adducts in the presence of adenine and guanine. Even with a large excess of oxaliplatin, only mono-adducts of these nucleobases were observed when the four of them were present. This follows the expected pattern of mono-substitution being favoured over di-substitution and a reduction in successive formation constants. Consecutive losses of H_2 , ammonia and nucleobases from each of the cisplatin–nucleobase adducts was demonstrated by multiple-stage tandem mass spectrometry (MSⁿ), enabling the determination of the fragmentation pathways for each adduct and the elucidation of their respective structures. It was demonstrated that ESI-MSⁿ is an ideal technique for studying these type of adducts, since structural information can be obtained in relatively short periods of time and the disadvantages of NMR and X-ray crystallography are avoided. These results provide the initial step towards a more complete understanding of the interaction and binding mode of the drug with intact DNA, where other factors such as steric hindrance and binding site geometry might have influence on the binding sites and the stability of the drug complex.

Le Pla *et al.*¹⁴⁸ have developed a HPLC-ESI-MS/MS method that is capable of specifically measuring 1,2-d(GpG) and 1,2-d(ApG) oxaliplatin intra-strand crosslink adducts in DNA from liver, lung and kidney samples obtained from wild-type and GSTP1/2 null mice treated with the drug. Limits of detection for 1,2-d(GpG)-oxPt and 1,2-d(ApG)-oxPt were 23 and 19 adducts per 10^8 nucleotides, respectively. The main advantages of this methodology over ^{32}P post-labelling are the relatively quicker and easier sample preparation for the analysis, providing structural information that specifically identifies the adduct being analysed. No significant differences were observed in the levels of intra-strand crosslinks formed by oxaliplatin between the mouse strains in liver, kidney and lung DNA.

3.5.2 Interaction with other cellular biomolecules. Other cytoplasmic biomolecules that are likely to interact with Pt-drugs include phosphate or carboxylate anions, sulfur-containing aminoacids: cysteine and methionine, that may act latter as an storage for the drug, thiol-containing molecules such as the peptide glutathione (γ Glu-Cys-Gly, GSH), cysteine-rich proteins such as metallothioneins (MT), and other globular proteins in the cellular cytoskeleton such as actin C, actin F or tubulin.

These secondary interactions may dramatically decrease the amount of free drug available to react with DNA, thus, reducing the cytotoxic effect in the cell. Moreover, those processes may be involved in the resistance observed in some

tumours (Fig. 5) and the severe side-effects the treatment implies. For these reasons, the study of the interactions between Pt-drugs and cytoplasmic compounds has become a question of paramount importance. Among these, sulfur-containing MTs and GSH have been subjects of particular interest.¹⁴⁹ When over-expressed, MTs have been proved to increase cell resistance to cisplatin and to reduce its nephrotoxicity.¹⁵⁰ Moreover, in cancer cells basal MT levels are especially increased. In the case of GSH, a decrease in its cellular levels reduces the resistance to the drug and increases its cytotoxic effect.¹²⁴ New generation Pt-based drugs have been designed to reduce the interaction with cytosolic sulfur-containing molecules and the resistance processes observed in cisplatin and carboplatin treatments. For instance, picoplatin, currently in phase III trials, presents a steric bulk around the Pt centre that leads to a decreased inactivation of the drug in presence of GSH¹⁵¹ or MT.¹⁵²

3.5.2.1 Metallothioneins. Metallothioneins are low molecular weight, cysteine-rich (20 Cys residues) proteins known to bind several metals, such as Cd, Zn, Cu, Hg, with high affinity, producing metal–thiolate clusters. Each MT molecule is able to bind up to 7 atoms of Zn, Cd or Hg.¹⁵³ In the case of Cu, the protein binds up to 12 atoms. Among those elements, Zn may be easily displaced by other metals, conferring on MT the ability to coordinate with potentially toxic metals present in the cell and consequently, leading to a detoxifying effect.

Coordination to Pt has also been proposed. Indeed, zinc's displacement in the presence of cisplatin has been demonstrated by SEC-ICP-MS, while cadmium atoms remained bound to the protein.¹⁵⁴ However, Hargman *et al.*¹⁵⁵ observed that not only Zn is displaced in MT in the presence of cisplatin but also Cd, making use of SEC with AAS detection. The key for these contradictory results may lay on the pH and the cisplatin/MT ratio assayed. In fact, the influence of the pH on the binding of Zn and Cd to MTs has been revealed by ESI-MS analyses.¹⁵⁶ Simulating physiological conditions and pharmacological cisplatin levels, it was confirmed by SEC-ICP-MS that only Zn is rapidly displaced from MT by cisplatin.¹⁵⁷ There is still scarce work directed to identify the cisplatin species that react with MT. Making use of X-Ray diffraction experiments, Pattanaik *et al.*¹⁵⁸ suggested that cisplatin loses both amine and chloro ligands, coordinating to 4 sulfur atoms from MT. Another recent study by Knipp *et al.*,¹⁵⁹ using simulated physiological conditions, confirmed by nESI-MS analyses that *cis*-[Pt(*N*-donor)₂Cl₂] compounds rapidly release all their ligands upon their reaction with Zn₇MT-2, in contrast to *trans*-[Pt(*N*-donor)₂Cl₂] compounds, which tend to retain their *N*-donor ligands. In both cases, the previously observed substitution of Zn atoms for Pt was demonstrated.

The kinetics of the reaction between cisplatin and MT has also been studied. Hargman *et al.*¹⁵⁵ proposed reaction rates between first and second order in excess of cisplatin. Knipp *et al.*¹⁵⁹ performed a kinetic study on the reaction of Zn₇MT-2 with a 2-fold molar excess of several *cis*- and *trans*-[Pt(*N*-donor)₂Cl₂] complexes, obtaining kinetic constants of the same order of magnitude as those previously reported. Kinetics experiments prove that the nature of the ligands attached to the metallic centre exerts a great influence on the

reaction parameters, due to the steric hindrance and the modulation of the Pt electrophilicity they may produce. Interestingly, *trans*-compounds reacted faster than their corresponding *cis*- isomers but to a similar extent.

Disagreement arises about cisplatin–MT adducts stoichiometry and binding sites. Cd₄–Pt_{*n*}–MT (*n* = 1–7) adducts were identified by nESI-MS, from incubations at neutral pH of MT in excess of the drug.¹⁵⁴ On the other hand, up to 10 molecules of cisplatin were observed to bind to MT exposed to an excess of the drug.¹⁵⁸ Furthermore, Knipp *et al.*¹⁵⁹ observed Zn_(7–*n*)Pt_{*n*}–MT-2 (*n* = 0–3) and Zn₄Pt₄–MT-2 adducts after the incubation with a two-fold molar excess of cisplatin.

Recently, a top-down approach¹⁶⁰ using nESI-Q-TOF allowed the identification of Cys5 and Cys7 as Pt-binding sites on MT incubated with cisplatin in a 1 : 5 molar ratio at neutral pH. However, apparently not only the highly reactive cysteine residues would be involved in the binding of Pt to MT. In fact, SEC-HPLC–UV¹⁵⁵ experiments showed that sequential reactions take place during the interaction of the drug with MT, at the beginning not affecting the thiol groups absorbance.

In brief, there are still contradictory results in the few studies concerning the characterisation of the binding of cisplatin to MT, due to the diverse experimental conditions of the *in vitro* incubations used. It is therefore crucial to simulate physiological conditions and therapeutic concentrations of the drug to get information, which might be interesting from the biomedical point of view.

3.5.2.2 Glutathione. Glutathione, GSH (γGlu-Cys-Gly), is a peptide present at the cytosol at mmol L^{–1} concentration levels. GSH–Pt-drugs complexes can be excreted *via* an ATP-dependent pump able to transport outside the cell molecules with the structure GS-X, producing cellular resistance against Pt-drugs (cisplatin,¹⁶¹ carboplatin, and to a lesser extent, new generation Pt drugs¹⁶²).

The interaction of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin with GSH has been extensively studied. Some approaches to the kinetics of the reaction reveal that, although cisplatin interacts more intensively with GSH than the other two drugs, the velocity of the reaction is, in the first stages, similar for cisplatin and oxaliplatin and up to five times faster than for carboplatin.¹⁶³ These experiments, carried out under physiological conditions, using HPLC–UV to monitor the Pt–S bond, also reveal a first order reaction between all these drugs and GSH. Dabrowiak *et al.*¹⁶⁴ performed similar studies by HPLC–UV and AAS, confirming the previously observed trend and concluding that the slow kinetics observed is in accordance with the efficient platination of DNA under mmol L^{–1} concentrations of GSH.

Structural elucidation of cisplatin–GSH adducts has also been performed. Miao *et al.*¹⁶⁵ have suggested several structures for these adducts based on ESI-MS results. Two molecules of cisplatin could bind to one or two molecules of GSH through their thiol groups, when incubations were prepared at molar ratio 1 : 1 in aqueous media. However, the unrealistic conditions used in these experiments put into question the actual production of these species *in vivo*, considering the drug : peptide ratio used, and taking into account that in these experiments the reactant was the diaqua- complex and not cisplatin, something

that is far from occurring *in vivo*. This may be the reason why Bernareggi *et al.*¹⁶⁶ could not identify in real samples what they were able to characterise *in vitro*, incubating cisplatin and GSH (1 : 1) at pH 7.4. Furthermore, their results provided by HPLC-TQ MS/MS suggest a structure in which one cisplatin molecule binds to GSH, in contrast to the results by Miao *et al.*¹⁶⁵ Contradictions often reside in the different experimental conditions used. In order to shed light on the real nature of the adducts generated *in vivo*, incubations performed *in vitro* at physiological conditions (pH 7.4, 37 °C, 4.6 mM NaCl, 500 µM GSH, 1 µM cisPt) were studied by Esteban-Fernández *et al.*¹⁵⁷ Time-dependent evolution of the reaction, studied by SEC-ICP-MS, allowed the monitorisation of the incubation mixtures, finding out that two main species were produced. It has been shown that GSH is able to react with both, the cisplatin monoaqua-derivative and the dimer. Analysis by ESI-LIT-MS/MS also allowed the identification of one of the compounds, previously described by Miao *et al.*,¹⁶⁵ in which two cisplatin molecules react with a GSH molecule. All these facts highlight again the need to simulate physiological conditions and therapeutic concentrations of the drug, in order to characterise the real adducts that may be present in clinical samples.

3.5.2.3 Other biomolecules. Some other potential ligands present at the cell have been object of study in an attempt to get a better understanding of the reactivity of Pt-drugs towards different cellular biomolecules, and to set the basis for the development of a reliable analytical methodology that may be useful for the characterisation of the Pt bio-compounds that may be formed *in vivo* in cells and tissues.

Although sulfur-containing groups in proteins, such as the aminoacids methionine or cysteine, have been considered as the main binding sites for Pt-based drugs, recent articles postulate *O*- and *N*-donors as other occurring binding sites. Bovine erythrocyte superoxide dismutase was incubated with a 10-fold excess of cisplatin and analysed by X-Ray diffraction.¹⁶⁷ Results showed His19 as the primary binding site for the drug, above Cys or Met residues. Similarly, the binding of cisplatin, transplatin, carboplatin or oxaliplatin to hen egg white lysozyme was studied at incubation ratios of 3 : 1 and analysed by ICP-OES,¹⁶⁸ showing low platination levels for all the drugs tested. ESI-MS experiments revealed predominantly platinated mono-adducts, suggesting the presence of a preferential Pt binding site, which was identified by X-Ray diffraction analysis as the imidazole N ϵ of His15. Additionally, using ESI-MS, Miao *et al.*¹⁶⁵ observed the participation of *N*-donors in the interaction of several sulfur-containing peptides with the cisplatin diaqua-complex. The adduct formed with Met-Arg-Phe-Ala involves peptide cyclation as a result of the interaction of the drug's derivative with both the N-terminus and the sulfur in the methionine residue. On the other hand, the peptide (Ac)-Met-Ala-Ser coordinates to the diaqua-complex through the S in methionine and the deprotonated N in the amide adjacent to the acetate group.

An innovative approach for the elucidation of the binding sites of Pt-based drugs was proposed by Yang *et al.*¹⁶⁹ on the study of the interaction of carboplatin with cytochrome C (Cyt C). A great excess of the drug was used in the incubations, but the

observed stoichiometry carboplatin: Cyt C was 1 : 1 and 2 : 1 at pH 5.0 and 37 °C, while it was only 1 : 1 at pH 7.0 and 37 °C (closer to physiological conditions). However, the most relevant conclusion reached was that carboplatin induces the rupture of Cyt C on acidic conditions at high temperature (pH 2.5 and 50 °C), cleaving the peptide bond adjacent to the binding site. The ESI-MS and MS/MS analysis of the induced fragments allowed a straightforward identification of the binding sites of carboplatin, which turned out to be Met65 and to a lesser extent, Met80, thus, making unnecessary the use of an endopeptidase for this purpose.

The interaction of Pt-drugs with Cyt C has been object of further research, bearing in mind that this model protein presents several potential binding sites: Cys14, Cys17, Met65, Met80, His18, His26 and His33. Casini *et al.*¹⁷⁰ studied different Pt-protein adducts from incubations of Cyt C with either cisplatin, transplatin, carboplatin or oxaliplatin, in a drug molar excess ranging from three- to ten-fold, at pH 7.4, 37 °C, at different incubation times. Results obtained by ICP-OES indicated a significant degree of cytochrome C platination (1.2 to 1.5 mol of Pt per Cyt C) for all the drugs tested at a 3-fold excess, 72 h, while at a 10 fold-excess, 168 h, platination levels increased (6.7 and 5 moles per Cyt C, for cisplatin and carboplatin, respectively). Strikingly, the four Pt-drugs showed a similar pattern of reactivity with the protein, in contrast to the previously established different reactivity of these compounds. On the other hand, UV-visible spectra showed that the main visible bands on Cyt C and thus, the chromophore, remain unaltered in the presence of Pt-drugs. Furthermore, ESI-MS direct analysis of the samples revealed several adducts with Pt:protein stoichiometries of 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1 or even 4 : 1, at the different incubation conditions, showing the survival of the adducts during the ionisation process. The authors predicted Met65 as the primary binding site and His26 and His33 as secondary binding sites.

In a subsequent article,¹⁷¹ ESI-MS experiments were performed on incubations of carboplatin and Cyt C, prepared either in water (pH 5-6), in ammonium carbonate (pH 7.4), or in TMeAmAc (tetramethylammonium acetate) buffer (pH 7.4) with Pt:protein ratios of 3 : 1 or 10 : 1. Considering their results, the reactivity of carboplatin, which is considerably low in aqueous solution, is enhanced in the presence of certain compounds, such as Cyt C. Its binding to the protein occurs giving rise predominantly to 1 : 1 adducts, either by losing the cbdca (1,1-Cyclobutanedicarboxylate) ligand or through a ring-opening reaction, keeping the cbdca and releasing the amine. Moreover, the influence of the incubation conditions on the adducts generated was confirmed, showing that the carbonate buffer induces an increase on the amount of cisplatin-like species bound to Cyt C. It was demonstrated, as well, that the platinated protein maintains its ability to react with 5'-GMP, producing ternary complexes. Finally, proteolysis of the incubation solutions with Asp-N, gave rise to platinated peptides, in which Met65 was the primary binding site and the histidines the secondary sites. Contrary to Yang *et al.*,¹⁶⁹ these authors discarded Met80 as a possible binding site, due to its participation in the coordination to iron in the heme pocket. However, no MS/MS experiments and thus, no sequencing, were performed in order to prove these hypotheses.

Ubiquitin, which is relevant as a tag for protein degradation, has also been selected as a model protein to study protein interactions with Pt-based drugs. It is a small protein, 8565 Da, containing Met and His, both reactive aminoacids towards Pt. The utility and potential of mass spectrometry techniques for the study of platinated adducts have been demonstrated again on the aforementioned model. Gibson *et al.*¹⁷² analysed by ESI-MS aqueous incubations of ubiquitin with cisplatin, using different reaction conditions. Several monoadducts, and also less abundant biologically unrealistic diadducts and triadducts were observed after 15 days in ten-fold excess cisplatin incubation, with no unreacted protein remaining in solution. The characterisation of the adducts was based exclusively on the masses observed, on the coordination chemistry of Pt and on the parallel results provided by transplatin and *cis*-[Pt(en)Cl₂]. In this way, the mechanism of the formation of monodentate, bidentate and tridentate adducts was proposed, discarding as an explanation the loss of ligands during the ionisation process. A kinetics study revealed the quick binding of the first Pt moiety giving rise to an initially monodentate adduct, and its conversion into bidentate or tridentate over time. Comparing the observed reaction kinetics with that of the protein containing an oxidized Met1, less reactive, Met1 was proposed as the main binding site for cisplatin, while His68 would remain as a secondary option. Interestingly, tryptic digests of adducts provided no Pt-containing fragments, being the authors explanation that the overnight treatment with NH₄HCO₃ may release the Pt moiety from the protein. Finally, experiments in non-denaturing conditions demonstrated that the bidentate monoadducts do not disrupt the folding of the protein, while tridentate adducts, which exist in two conformations, are able to unfold it.

An interesting comparative study on the use of MALDI-TOF, nESI-IT-MS and nESI-Q-TOF was performed by Hartinger *et al.*,¹⁷³ on incubations, in water at 37 °C of cisplatin, transplatin or oxaliplatin with ubiquitin at a molar ratio of 2:1. Their results are in good agreement with those from Gibson *et al.*¹⁷² indicating that all the drugs tested give rise to the formation of mainly monoadducts and to a lesser extent, diadducts and even triadducts in the case of cisplatin. Cisplatin and transplatin form similar species with Ub, with differences laying on their different stability and hydrolysis pathways, being Ub-[Pt(NH₃)₂] and Ub-[Pt(NH₃)₂Cl] the most abundant adducts observed for cisplatin and transplatin, respectively. For oxaliplatin, the predominant adduct was Ub-[Pt (cyclohexane-1,2-diamine)], involving the release of the oxalate ligand. The study revealed subtle differences in the results depending on the ionisation technique and the mass analyser used. In this sense, nESI-QTOF allowed the characterisation of several mono- and di-adducts for cisplatin and transplatin. Using nESI-IT-MS the detection of diadducts of oxaliplatin was possible. Although the suitability of MALDI-TOF for this purpose was also demonstrated, the higher degree of fragmentation induced on the adducts, makes this technique a less attractive choice than ESI-based instruments, being the former only a real option for the study of small metalloproteins.

Recently, a top-down mass spectrometric approach, making use of ESI-FT-ICR-MS/MS,¹⁷⁴ was applied on the study of

the interaction of cisplatin, transplatin and oxaliplatin on ubiquitin. Results from the direct analyses of incubations of the drugs with the protein, indicate that both cisplatin and oxaliplatin bind to N-terminal fragments containing Met1 (¹Met-Gln² and ¹Met-Gln-Ile-Phe⁴, respectively), whereas transplatin is bound within the sequence ¹⁹Pro-Ser-Asn-Thr-Ile-Glu²⁴ (containing several potential donor atoms). These are in agreement with previous results based on indirect methods, but surprisingly, according to this, His68 would not to constitute a significant binding site for none of the compounds tested. This methodology allows a direct determination of the primary binding sites, avoiding the digestion involved in classical bottom-up approaches and its possible subsequent reactions.

Recently, Moreno-Gordaliza *et al.*¹⁷⁵ demonstrated the capabilities of a top-down mass spectrometric approach using an affordable linear ion trap (LIT) for the full characterisation of small platinum-binding proteins. For this purpose, insulin, a serum protein that presents several histidines and cystines, which are potential binding-sites for platinum, was selected as a model. *In vitro* incubations were prepared under acidic and physiological conditions at 1:1 or 1:5 insulin:cisplatin molar ratios and different incubation times. SEC-ICP-MS analysis enabled the specific detection of Pt-containing species attributed to the binding of the drug to the protein. Further analysis through MALDI-TOF-MS and nESI-LIT-MS allowed the identification of platinated mono-, di-, and even triadducts in the incubations. The zoom scan mode provided by the LIT offered enough resolution to discern the isotopic pattern of ions, allowing the differentiation of Pt-containing ions as can be seen in Fig. 7. Pt binding sites were identified by CID-MSⁿ as: B Chain N-terminus, His5, and His10 residues, finding also evidence on the binding of Pt to B Chain Cys7. Although the main adduct observed for acidic incubations ([insulin + Pt(NH₃)₂Cl]) differs from the main adducts observed for physiological conditions ([insulin + Pt(NH₃)₂] and [insulin + Pt(NH₃)₂H₂O]), the Pt binding sites turned out to be the same in all the cases.

3.5.3 Biospeciation of Pt-based drugs in real samples. So far, most of the studies have dealt with the interaction of Pt with biomolecules making use of *in vitro* incubations of the drugs with standard reagents. It is of particular importance to extend their application to real samples from *in vivo* assays, in order to confirm the results previously obtained. However, in contrast to serum or urine samples, cellular tissues from living organisms imply a complexity that makes them difficult to deal with, considering the current sample treatment methods and analytical techniques. This may be the reason for such a scarce number of articles in this field.

Speciation studies were performed on kidney and inner ear cytosols from rats treated with cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, using two dimensional liquid chromatography separations and serving as a starting point to develop a methodology for the separation of Pt-containing biomolecules present in tissues. Analysis by SEC-ICP-MS and further analysis by SAX-ICP-MS with a previous head-column focusing of selected fractions, obtained in the first dimension separation, were carried out. Results demonstrated that Pt-drugs present

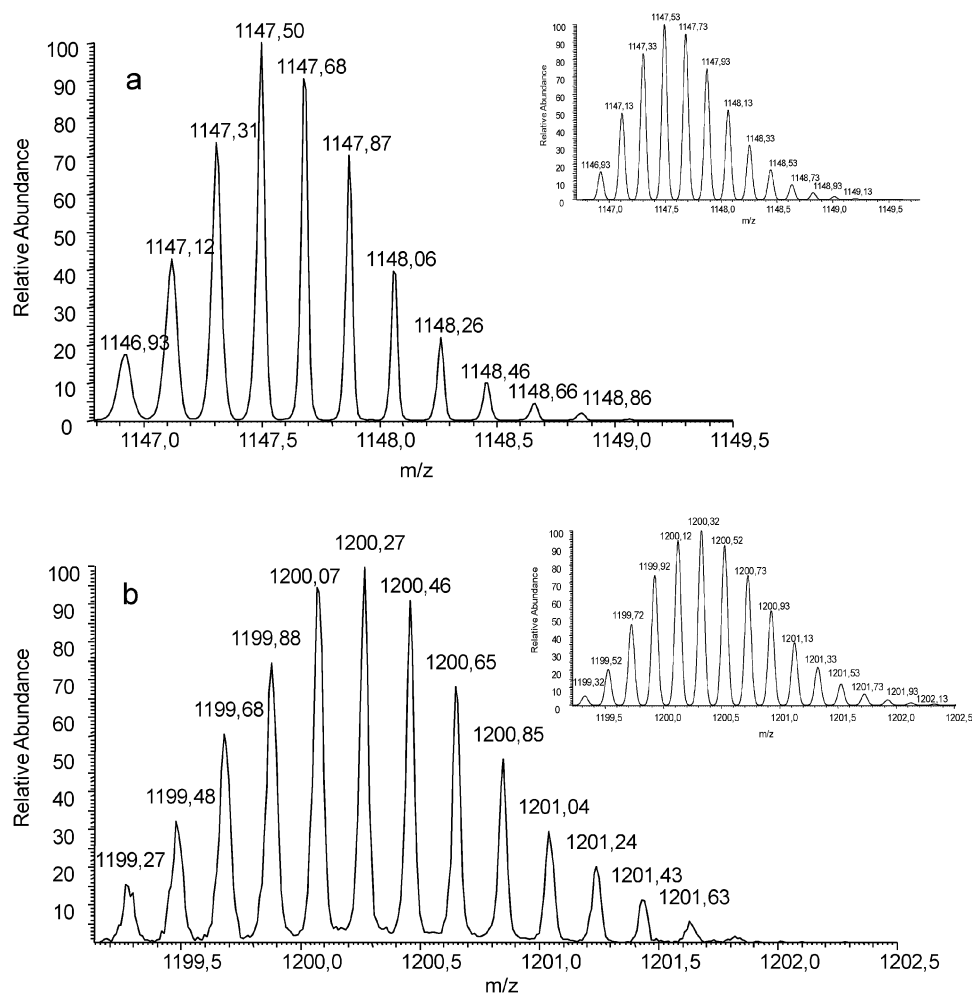


Fig. 7 Ultrazoom scan nESI-LIT spectra of a mixture of insulin : cisplatin 1 : 5 incubated for 96 h in 0.1% TFA at 37 °C showing (a) the insulin ion with charge + 5 at m/z 1146.93 and (b) a platinumated insulin ion at m/z 1199.27 corresponding to $[\text{insulin} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl} + 4\text{H}]^{5+}$. Their respective theoretical isotopic patterns are included as insets for comparison.

at the cytosol are completely bound to biomolecules, being predominantly bound to compounds of 25–65 kDa and around 12 kDa for the inner ear, while in the case of kidney and liver, the main Pt-compounds comprised masses of 50–60 kDa and around 20 kDa.^{116,157}

The stability and strength of the drug–biomolecule adducts should be studied in order to explore high resolution separation strategies that involve more aggressive sample treatments. In this way, the cytosolic fractions of kidney and ear impacted by cisplatin were subjected to several treatments common in gel electrophoresis, employing SDS, BME (β -mercaptoethanol), heating and sonication. Analysis by SEC-ICP-MS revealed that cisplatin–biomolecule interactions resisted denaturing conditions, basing on the absence of the peak corresponding to free cisplatin in the treated samples and the non significant chromatographic differences observed between treated samples and the original ones.³⁵

Indeed, gel electrophoresis has already been successfully applied for the separation of Pt-containing proteins. In particular, Allardyce *et al.*³⁷ administered cisplatin to *Escherichia Coli* cells, and proteins were partially separated by SDS-PAGE, followed by a Pt total content analysis by laser ablation

ICP-MS. Membrane proteins were identified in a Pt-rich electrophoretic band by RP-ESI-Q-TOF, after an in-gel tryptic digestion. In this case, the outer membrane protein A (ompA) was identified and pointed out to be involved in the cellular cisplatin intake.

Moreover, a highly interesting study was recently presented by Will *et al.*,¹⁷⁶ in which MudPIT was used to elucidate cisplatin binding sites in a whole cell system. MudPIT was applied on tryptic digests of extracts from *Escherichia Coli* cells treated with cisplatin at pH 7.0. MS/MS spectra were analysed by SEQUEST, making use of a search file where Pt-modified aminoacids had also been included. 31 protein targets were found for cisplatin, including DNA- and RNA-binding proteins, stress regulated proteins, enzymes and resistance efflux proteins. The main Pt coordination sites in the proteins were successfully identified as Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr and Met. The level of detection of proteins with this technique is at 100 copies per cell, with a background of an abundant protein present at 10^6 copies. Therefore, at least 10% of the less abundant proteins must be platinumated at a single site in order to be detected. In this case, some platinumated peptides from those proteins were only probably be detectable because a high

Table 1 Summary of the most relevant works in Pt-containing drugs analysis

Ref.	Technique	Drug	Sample	Research topic
55	HPLC(RP)-ICP-MS, HPLC(RP)-UV	Cisplatin	Drug aqueous solution	Cisplatin interaction with mobile phases
57	HPLC(RP)-ESI-MS	Cisplatin	Drug aqueous solution	Evolution of the drug
58	HPLC-ICP-MS	Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin	Wastewater from hospital	Separation of cisplatin, carboplatin, oxaliplatin and their derivatives
60	HPLC(RP)-UV, RMN	Cisplatin	Drug aqueous solution	Conditions for the analysis of cisplatin and its derivatives
63	HPLC(RP)-UV, ESI-MS	Carboplatin	Drug aqueous solution	Evolution of the drug
64	HPLC(RP)-UV-ESI-MS	Carboplatin	Drug aqueous solution	Evolution of the drug
65	HPLC-ESI-MS	Oxaliplatin	Drug aqueous solution	Evolution of the drug
33	HPLC, GFAAS	Cisplatin	Plasma	Evolution of the drug
34	ICP-MS, ICP-AES	Cisplatin	Plasma	Free drug quantification
45	HPLC(RP)-ICP-MS, HPLC(RP)-ESI-Q-TOF	Cisplatin	Human serum	Interaction of Tf and HSA with the drug
52	HPLC(SCX-SAX)-UV	Cisplatin	Plasma	Evolution of the drug
54	HPLC-UV	Cisplatin	Blood, plasma, ultrafiltered plasma (UFP)	Evolution of the drug
53	HPLC-UV	Cisplatin	Blood	Evolution of the drug
56	RMN	Cisplatin	Drug aqueous solution, UFP	Evolution of the drug
69	ICP-AES, ET-AAS	Cisplatin and other Pt-based drugs	UFP	Quantification of the drug bound to proteins
70	SEC-ICP-MS	Cisplatin	Serum	Separation of free drug and drug-binding proteins
71	Voltammetry	Cisplatin	Serum, urine	Drug quantification
73	HPLC(RP)-ESI-MS	Carboplatin	UFP, tumoral tissue	Free drug quantification
74	SEC-ICP-MS	Carboplatin	Plasma	Drug-protein interactions
75	HPLC(RP), FAAS	Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin and others	Blood, red cells, plasma, cellular lines	Drug distribution, biotransformation, cytotoxicity
78	SEC-ICP-MS, SEC-ESI-MS	Oxaliplatin	UFP, red cells, urine	Drug biotransformation
65	HPLC-ICP-MS	Oxaliplatin	UFP, GSH, Met, Cys	Interaction of sulfur-containing biomolecules with the drug
80	CE-ICP-MS	Cisplatin	HSA	HSA-Drug interaction
81	CE-UV	Cisplatin, oxaliplatin	HSA, Tf	Interaction of blood serum proteins with the drugs
84	GFAAS, UV, CD, Fluorescence	Transplatin	HSA	HSA-Drug interaction
86	NMR	Cisplatin	HSA	Binding sites to HSA
87	2D-LC-ESI-MS	Cisplatin	Blood serum/Drug incubations	Binding sites to HSA and Tf
91	ESI-Q-TOF, UV/Vis	Cisplatin	Tf	Tf-Drug interaction
92	ESI-TOF-TOF	Cisplatin	Tf	Tf-Drug interaction
94	HPLC-UV, CE-UV NMR	Cisplatin	Tf	Tf-Drug interaction
96	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Oxaliplatin	holoTf	holoTf-Drug interaction
97	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin	Red cells, Hb	Hb-Drug interaction
98	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatin	Hb	Hb-Drug interaction
99	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatin	Hb	Hb-Drug interaction
100	ESI-Q-TOF	Oxaliplatin	Red cells, Hb	Hb-Drug interaction
101	DF-ICP-MS	—	Urine	Quantification of physiological Pt levels
103	HPLC(RP)-ICP-MS, FAB-TQ, NMR	Cisplatin, carboplatin	Urine, creatinine, urea, uric acid	Drug biotransformation in urine
30	NAA	Cisplatin	Fluids, tissues	Pt quantification in fluids and tissues
35	FIA-ICP-MS, SEC-ICP-MS	Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin	Rat tissues	Drug distribution among cellular fractions. Accumulation/elimination in tissues
114	X-Ray Fluorescence	Cisplatin	Fluids, tissues	Pt quantification in fluids and tissues
115	Gamma spectroscopy	Cisplatin	Human body	Pt distribution in tissues
116	SEC-ICP-MS, AE-ICP-MS	Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin	Rat tissues	Separation of Pt-adducts
118	ICP-MS	Cisplatin, carboplatin	Blood, red cells, urine, tissues	Pt quantification in fluids and tissues
43	ICP-MS	Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin and others	Cellular culture	Drug uptake by the cell
144	HPLC(RP)-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatin	Nucleotides, DNA	Speciation of DNA nucleotides-Drug adducts

Table 1 (continued)

Ref.	Technique	Drug	Sample	Research topic
145	HPLC(RP)-ICP-MS	Cisplatin	<i>Drosophila Melanogaster</i> DNA treated with the drug	Detection of DNA–Drug adducts and correlation with genotoxic damage
132	nESI-FT-ICR	Cisplatin	Oligonucleotides	Characterisation of Pt-binding sites, kinetics studies
133	AAS, ELISA, immunocytochemistry	Carboplatin	DNA from rat tissues	Identification and quantification of the drug–DNA adducts
142	HPLC(IC)-UV-ICP-SFMS	Cisplatin	5'-GMP	Identification of 5'-GMP–cisplatin adducts
143	ESI-FT-ICR	Cisplatin	DNA oligonucleotides	Characterisation of oligonucleotides–drug adducts, kinetics studies
146	Adsoptive Stripping Voltammetry	Oxaliplatin	White blood cells from oncological patients	Time-dependent formation of oxaliplatin–DNA adducts
147	ESI-LIT	Oxaliplatin	DNA nucleobases	DNA nucleobases–drug interaction
148	HPLC(RP)-ESI-TQ	Oxaliplatin	DNA from mouse tissues	Determination of GG- and AG- drug intrastrand crosslinks
154	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatin	MT	Binding of Zn, Cd and Pt to MT, stoichiometry
155	HPLC-AAS, RP-HPLC-UV	Cisplatin	MT	Binding of Zn, Cd and Pt to MT, binding kinetics
157	SEC-ICP-MS, ESI-LIT	Cisplatin	Rat tissues, GSH, MT	GSH and MT-Drug interactions
158	X-ray diffraction	Cisplatin	MT	Binding of cisplatin to MT
159	nESI-Q-TOF, AAS	Pt(II) complexes	MT	Reaction and kinetics of MT–Pt complexes
160	nESI-Q-TOF	Cisplatin	MT	Structural study of the drug–protein adducts
163	HPLC(RP)-UV, AAS	Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin	GSH	Kinetics of the Drug–GSH interaction
164	HPLC(RP)-UV, AAS	Cisplatin	GSH, WR-1065, 2-mercaptoethanesulfonate	Kinetics of the Drug–Thiols interaction
165	ESI-IT	Pt(II) complexes	GSH, MAS, AcMAS, MRFA	Sulfur-peptides interaction with Pt(II) complexes
166	HPLC(RP)-tQ, RP-HPLC-UV, AAS	Cisplatin	GSH, human and rat plasma, UFP	Drug–GSH adducts characterisation
167	X-Ray Diffraction	Cisplatin	Superoxodismutase	Structural study of the drug–protein adducts
168	ESI-LIT, ICP-OES, X-ray Diffraction	Cisplatin, transplatin, carboplatin, oxaliplatin	Hen egg lysozyme	Lysozyme-drug interaction
169	ESI-IT	Carboplatin	Cytocrome-C	Cytocrome C-Drug interaction
170	ESI-LIT, ICP-OES, UV	Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, transplatin	Cytocrome-C	Cytocrome C-Drug interaction
171	ESI-LIT	Carboplatin, others	Cytocrome-C	Cytocrome C-Drug interaction-binding sites
172	ESI-tQ	Cisplatin, others	Ubiquitin	Ubiquitin-Drug interaction
173	nESI-Q-TOF, nESI-IT, MALDI-TOF	Cisplatin, transplatin, oxaliplatin	Ubiquitin	Ubiquitin-Drug interaction
174	ESI-FT-ICR	Cisplatin, transplatin, oxaliplatin	Ubiquitin	Structural study of the drug–protein adducts
175	SEC-ICP-MS, nESI-LIT, MALDI-TOF	Cisplatin	Insulin	Characterisation of cisPt–insulin adducts
37	SDS-PAGE, LA-ICP-MS, RP-ESI-Q-TOF	Cisplatin	<i>E. Coli</i> cells	Identification of Pt-containing proteins
176	2D-SCX-RP-ESI-LIT	Cisplatin	<i>E. Coli</i> cells	Identification and characterisation of Pt-containing proteins
177	2D-DIGE, MALDI-TOF	Cisplatin	Cochleas from rats	Quantitative proteomics on cochleas after drug administration
117	ICP-MS	Cisplatin	Brain and cochlea from rats	Pt accumulation in organs

amount of cisplatin was used in the incubations. This is the main drawback concerning the applicability of this technique on real samples.

On the other hand, Coling *et al.*¹⁷⁷ demonstrated the changes in the expression of 22 cochlear proteins after the administration of cisplatin on rats, using 2D-DIGE (two

dimensional difference gel electrophoresis) and MALDI-TOF analysis. Five proteins underwent an increase in their expression while seventeen proteins decreased significantly after the cisplatin administration. Seven additional cochlear proteins were identified with less significant drug-induced changes. Those results were interpreted considering the functions of the identified proteins. Therefore, this work constitutes a pioneer proteomics study related to the ototoxicity produced by cisplatin.

4. Conclusions

Pt-based drugs efficacy is limited by their interactions with different biomolecules along their way to the therapeutic target. Metallomics studies clearly offer a way to improve the knowledge about the behaviour of these drugs in the organism.

Some disagreements in the different studies performed pointed out the complicated interpretation of *in vitro* experiments, where small differences could result in contradictory conclusions. Furthermore, the low content of Pt-adducts and the complexity of real samples pose new challenges. To deal with these difficulties, refined analytical methodologies must be used.

Special attention must be paid to avoid bio-transformation or cleavage of the Pt-adducts along the sample preparation and analytical procedures. Even the original structure of the Pt-drug administered should be controlled to avoid dealing with its derivatives. Unfortunately, few papers discuss the stability of the sample.

Different separation and detection techniques may be combined to improve analytical results and/or to obtain more specific information. However, the high complexity of real samples makes recommendable the complementary use of both a molecular and elemental mass spectrometric detection technique. Pt and other elements can be highly sensitively monitored by LC-ICP-MS to follow Pt-species along the separation processes. Further structural information of the preconcentrated and purified Pt-adducts may be obtained by ESI-MS (Table 1).

Acknowledgements

This work was financially supported by the Spanish CICYT projects CTQ-2005-08593 and CTQ-2008-04873. D.E. gratefully acknowledges the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and the European Union for the post-doctoral fellowship and the Marie Curie contract, respectively.

References

- X. Sun, C.-N. Tsang and H. Sun, *Metallomics*, 2009, **1**, 25–31.
- S. Mandel, T. Amit, O. Bar-Am and M. B. H. Youdim, *Prog. Neurobiol.*, 2007, **82**, 348–360.
- M. A. Jakupc, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger and B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2008, 183–194.
- Z. Guo and P. J. Sadler, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1999, **38**, 1512–1531.
- C. F. Shaw III, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2589–2600.
- S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini and L. Messori, *Med. Res. Rev.*, 2009, DOI: 10.1002/med.20168.
- M. A. Jakupc and B. K. Keppler, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004, **4**(15), 1575–1583.
- M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **236**, 209–233.
- F. Pruchnik and D. Dus, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **61**, 55–61.
- A. Alama, B. Tasso, F. Novelli and F. Sparatore, *Drug Discovery Today*, 2009, **14**, 500.
- A. M. Ramos, C. Fernández, D. Amrán, D. Esteban, E. de Blas, M. A. Palacios and P. Aller, *J. Cell. Physiol.*, 2006, **209**, 1006–1015.
- B. Rosenberg, L. van Camp and T. Krigas, *Nature*, 1965, **205**, 698–699.
- P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick and S. J. Lippard, *Nature*, 1995, **377**, 649–652.
- R. C. Todd and S. J. Lippard, *Metallomics*, 2009, **1**, 280–291.
- C. L. Litterst, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1981, **61**, 99–108.
- C. Schaake-Koning, W. Van den Bogaert and O. Dalesio, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 524–530.
- J. Cassidy, *Int. J. Clin. Pract.*, 2000, **54**, 399–402.
- F. I. Raynaud, P. Mistry, A. Donaghue, G. K. Poon, L. R. Kelland, C. F. J. Barnard, B. A. Murrer and K. R. Harrap, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1996, **38**, 155–162.
- L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, 2007, **7**, 573–584.
- N. Shah and D. S. Dizon, *Future Oncol.*, 2009, **5**, 33–42.
- M. J. Cleare and J. D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.*, 1973, **2**, 187–17.
- H. Haraguchi, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 5–14.
- D. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. van Leeven and R. Lobinski, *Pure Appl. Chem.*, 2000, **72**, 1453–1470.
- J. Szpunar, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 54–56.
- T. G. Appleton, J. R. Hall, S. F. Ralph and C. S. M. Thompson, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 1989–1993.
- K. Wang, J. Lu and R. Li, *Coord. Chem. Rev.*, 1996, **151**, 53–58.
- A. L. Rosen and G. M. Hieftje, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2004, **59**, 135–146.
- J. Szpunar, *Analyst*, 2005, **130**, 442–465.
- Z. H. Siddik, M. Jones, F. E. Boxall and K. R. Harrap, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1988, **21**, 19–24.
- K. Heydorn, B. Rietz and A. J. Krarup-Hansen, *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 1998, **11**, 37–43.
- Z. Yang, X. Hou and B. T. Jones, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2002, **37**, 57–88.
- O. Nygren, G. T. Vaughan, T. M. Florence, G. M. P. Morrison, I. M. Warner and L. S. Dale, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 1637–1640.
- M. Verschraagen, K. van der Born, T. H. Ursula Zwiers and W. J. F. van der Vijgh, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, **772**, 273–281.
- F. Morazzoni, C. Canevali, I. Moschetti, R. Todeschini, S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci, G. Ravasi, A. V. Bedini, F. Milani, M. Palazzi, S. Villa and G. Giudice, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1995, **35**, 529–532.
- D. Esteban-Fernández, J. M. Verdaguer, R. Ramírez-Camacho, M. A. Palacios and M. M. Gómez-Gómez, *J. Anal. Toxicol.*, 2008, **32**, 140–147.
- J. Szpunar and R. Lobinski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 404–411.
- C. S. Allardyce, P. J. Dyson, F. R. Abou-Shakra, H. Birtwistle and J. Coffey, *Chem. Commun.*, 2001, 2708–2709.
- I. Pizarro, M. Gómez, C. Cámara, M. A. Palacios and D. A. Román, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 292–296.
- A. R. Timerbaev, A. Küng and B. K. Keppler, *J. Chromatogr., A*, 2002, **945**, 25–44.
- B. Cañas, D. López-Ferrer, A. Ramos-Fernández, E. Camafeita and E. Calvo, *Briefings Funct. Genomics Proteomics*, 2006, **4**, 295–320.
- A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. R. Fernández de la Campa, J. Ruiz Encinar and J. Bettmer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 3–16.
- A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 885–894.
- A. R. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano and D. Osella, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 73–78.
- B. Cañas, C. Piñeiro, E. Calvo, D. López-Ferrer and J. M. Gallardo, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1153**, 235–258.
- D. Esteban-Fernández, M. Montes-Bayón, E. Blanco González, M. M. Gómez-Gómez, M. A. Palacios and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 378–384.
- K. Weidt, C. Logan Mackay, P. R. R. Langridge-Smith and P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 2007, 1719–1721.
- C. J. Boreham, J. A. Broomhead and D. P. Fairlie, *Aust. J. Chem.*, 1981, **34**, 659–664.

- 48 T. G. Appleton, R. D. Berry, C. A. Davis, J. R. Hall and H. A. Kimlin, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 3514–3521.
- 49 S.E. Miller and D. A. House, *Inorg. Chim. Acta*, 1989, **161**, 131–137.
- 50 S. E. Miller and D. A. House, *Inorg. Chim. Acta*, 1989, **166**, 189–197.
- 51 S. E. Miller and D. A. House, *Inorg. Chim. Acta*, 1990, **173**, 53–60.
- 52 A. Andersson and H. Ehrsson, *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, 1994, **652**, 203–210.
- 53 A. Andersson, J. Fagerberg, R. Lewensohn and H. Ehrsson, *J. Pharm. Sci.*, 1996, **85**, 824–827.
- 54 A. Andersson and H. Ehrsson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, **13**, 639–644.
- 55 O. Heudi, A. Cailleux and P. Allain, *Chromatographia*, 1997, **44**, 19–24.
- 56 K. H. Briere, R. Goel, F. H. Shirazi, D. J. Stewart and C. P. Smith, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1996, **37**, 518–524.
- 57 M. Cui and Z. Mester, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 1517–1527.
- 58 S. Hann, Z. Stefanka, K. Lenz and G. Stinger, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**, 405–412.
- 59 M. Cui, L. Ding and Z. Mester, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 5847–5853.
- 60 M. El-Khateeb, T. G. Appleton, B. G. Charles and L. R. Gahan, *J. Pharm. Sci.*, 1999, **88**, 319–326.
- 61 R. J. Knox, F. Friedlos, D. A. Lydall and J. J. Roberts, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 1972–1979.
- 62 K. Aabo, M. Adams, P. Adnitt, D. S. Alberts, A. Athanaziou, V. Barley, D. R. Bell, U. Bianchi, G. Bolis, M. F. Brady, H. S. Brodovsky, H. Bruckner, M. Buyse, R. Canetta, V. Chylak, C. J. Cohen, N. Colombo, P. F. Conte, D. Crowther, J. H. Edmonson, C. Gennatas, E. Gilbey, M. Gore, D. Guthrie and B. Y. Yeap, *et al.*, *Br. J. Cancer*, 1998, **78**, 1479–1487.
- 63 K. Vivekanandan, M. G. Swamy, S. Prasad, G. C. Maikap, R. Mukherjee and A. C. Burman, *Int. J. Pharm.*, 2006, **313**, 214–221.
- 64 R. B. Burns, R. W. Burton, S. P. Albon and L. Embree, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, **14**, 367–372.
- 65 E. Jerremalm, M. Hedeland, I. Wallin, U. Bondesson and H. Ehrsson, *Pharm. Res.*, 2004, **21**, 891–894.
- 66 M. A. Graham, G. F. Lockwood, D. Greenslade, S. Brienza, M. Bayssas and E. Gamelin, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**, 1205–1218.
- 67 J. T. Reardon, A. Vaisman, S. G. Chaney and A. Sancar, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 3968–3971.
- 68 A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko and B. K. Keppler, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 2224–2248.
- 69 T. J. Einhäuser, M. Galanski and B. K. Keppler, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, **11**, 747–750.
- 70 J. Szpunar, A. Makarov, T. Pieper, B. K. Keppler and R. Lobinski, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **387**, 135–144.
- 71 A. Gerl and R. Schierl, *Acta Oncol.*, 2000, **39**, 519–522.
- 72 J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2499–2510.
- 73 P. Guo, S. Li and J. M. Gallo, *J. Chromatogr. A*, 2003, **783**, 43–52.
- 74 R. Xie, W. Johnson, L. Rodríguez, M. Gounder, G. S. Hall and B. Buckley, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 2815–2822.
- 75 L. Pendyala and P. J. Creaven, *Cancer Res.*, 1993, **53**, 5970–5976.
- 76 M. A. Graham, E. Gamelin, J. L. Misset, S. Brienza, P. Allain, M. Boisdron-Celle, A. Krikorian, D. Greenslade and M. Bayssas, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1998, **39**, 159.
- 77 M. A. Graham, S. Brienza, J. L. Misset, E. Cupissol, E. Gamelin and P. Allain, *Sanofi Research Report VAR3149*, 1998.
- 78 P. Allain, O. Heudi, A. Cailleux, A. Le Bouil, F. Larra, M. Boisdron-Celle and E. Gamelin, *Drug Metab. Dispos.*, 2000, **28**, 1379–1384.
- 79 B. P. Espósito and R. Najjar, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 137–149.
- 80 A. R. Timerbaev, S. S. Aleksenko, K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, O. Semenova, C. G. Hartinger, S. Oszwaldowski, M. Galanski, M. Jarosz and B. K. Keppler, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 1988–1995.
- 81 A. V. Rudnev, S. S. Aleksenko, O. Semenova, C. G. Hartinger, A. R. Timerbaev and B. K. Keppler, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 121–127.
- 82 A. Sugii, K. Nishimura, K. Harada, M. Nakayama and S. Masuda, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**, 408–410.
- 83 N. Ohta, T. Yotsuyanagi, D. Chen, R. Ono, S. Ito and K. Ikeda, *Int. J. Pharm.*, 1992, **85**, 39–44.
- 84 N. Ohta, D. Chen, S. Ito, T. Futo, T. Yotsuyanagi and K. Ikeda, *Int. J. Pharm.*, 1995, **118**, 85–93.
- 85 J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 1992, **198–200**, 873–881.
- 86 A. I. Ivanov, J. Christodoulou, J. A. Parkinson, K. J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow and P. J. Sadler, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 14721–14730.
- 87 J. Will, D. A. Wolters and W. S. Sheldrick, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 1696–1707.
- 88 E. N. Zhmareva, G. D. Zegzhda, G. B. Kasain and O. A. Livanskaya, *Ukr. Biokhim. Zh.*, 1996, **68**, 74–79.
- 89 L. Trynda-Lemiesz, H. Kozlowski and B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 141–146.
- 90 J. Ni, Y. Wang, Q. Wang, L. Lu and Q. Zheng, *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*, 1996, **16**, 246.
- 91 I. Khalaila, C. S. Allardyce, C. S. Verma and P. J. Dyson, *ChemBioChem*, 2005, **6**, 1788–1795.
- 92 C. S. Allardyce, P. J. Dyson, J. Coffey and N. Johnson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 933–935.
- 93 M. R. Schlachet and G. W. Bates, *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, 2182–2188.
- 94 M. C. Cox, K. J. Barnham, T. A. Frenkiel, J. D. Hoeschele, A. B. Mason, Q.-Y. He, R. C. Woodworth and P. J. Sadler, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 1999, **4**, 621–631.
- 95 T. Hoshino, M. Misaki, M. Yamamoto, H. Shimizu, Y. Ogawa and H. Toguchi, *J. Controlled Release*, 1995, **37**, 75–81.
- 96 Y.-Y. Zhao, R. Mandal and X.-F. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, **19**, 1956–1962.
- 97 R. Mandal, R. Kalke and X.-F. Li, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 1391–1397.
- 98 R. Mandal, C. Teixeira and X.-F. Li, *Analyst*, 2003, **128**, 629–634.
- 99 R. Mandal, R. Kalke and X.-F. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 2748–2754.
- 100 J. Peng, R. Mandal, M. Sawyer and X.-F. Li, *Clin. Chem.*, 2005, **51**, 2274–2281.
- 101 J. Begerow, M. Turfeld and L. Dunemann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, **11**, 913–916.
- 102 *Prospect from Platinol-AQ drug (cisplatin)*, Bristol Laboratories, Princeton, New Jersey 08543 USA, 1998.
- 103 X. Tang, J. W. Hayes II, L. Schroder, W. Cacini, J. Dorsey, R. C. Elder and K. Tepperman, *Met.-Based Drugs*, 1997, **4**, 97–108.
- 104 W. Cacini and Y. Singh, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1991, **197**, 285–289.
- 105 *Prospect from Carboplatin drug*, Pfizer Laboratories, Auckland, New Zealand, 2005.
- 106 N. D. Tinker, H. L. Sharma and C. A. McAuliffe, in *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy: Proceedings of the fifth international symposium*, ed. M. Nicolini and M. Nijhoff, Boston, 1987, p. 144.
- 107 J. Allen, M. A. Graham, J. Firth, S. Woolfrey, D. Greenslade, J. G. Morrison, S. McDougall, P. Ross and D. Cunningham, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1998, **39**, 159.
- 108 J. L. Misset and P. Allain, *Pharmacokinetics, urinary, and fecal excretion of oxaliplatin in cancer patients*, Debiopharm/Sanofi Report TDR3500, 1995.
- 109 S. McDougall and J. Allen, *In vitro stability of ³H-oxaliplatin in human plasma ultrafiltrate and urine*, Sanofi Research Report SPP0111, 1998.
- 110 E. E. Cohen, M. W. Ling and E. E. Vokes, *J. Clin. Oncol.*, 2004, **22**, 1743–1752.
- 111 P. T. Daley-Yates and D. C. H. McBrien, *Biochem. Pharmacol.*, 1985, **34**, 2363–2369.
- 112 N. D. Doolittle, L. L. Muldoon, R. E. Brummett, R. M. Tyson, C. Lacy, J. S. Bubalo, D. F. Kraemer, M. C. Heinrich, J. A. Henry and E. A. Neuwelt, *Clin. Cancer Res.*, 2001, **7**, 493–500.
- 113 L. M. Schuchter, *Eur. J. Cancer*, 1996, **32**, S40–42.
- 114 D. J. Stewart, R. S. Benjamin, M. Luna, L. Feun, R. Caprioli, W. Seifert and T. L. Loo, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1982, **10**, 51–54.

- 115 J. Areberg, S. Bjorkman, L. Einarsson, B. Frankenberg, H. Lundqvist, S. Mattsson, K. Norrgren, O. Scheike and R. Wallin, *Acta Oncol.*, 1999, **38**, 221–228.
- 116 D. Esteban-Fernández, M. M. Gómez-Gómez, B. Cañas, J. M. Verdager, R. Ramirez and M. A. Palacios, *Talanta*, 2007, **72**, 768–773.
- 117 R. Ramirez-Camacho, D. Esteban-Fernández, J. M. Verdager, M. M. Gómez-Gómez, A. Trinidad, J. R. García-Berrocal and M. A. Palacios-Corvillo, *Acta Oto-Laryngol.*, 2008, **128**, 505–509.
- 118 P. Tothill, H. S. Klys, L. M. Matheson, K. McKay and J. F. Smith, *Eur. J. Cancer*, 1992, **28**, 1358–1361.
- 119 D. P. Gately and S. B. Howell, *Br. J. Cancer*, 1993, **67**, 1171–1176.
- 120 S. Ishida, J. Lee, D. J. Thiele and I. Herskowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 14298–14302.
- 121 N. Pabla, R. F. Murphy, K. Liu and Z. Dong, *Am. J. Physiol.*, 2009, **296**, F505–F511.
- 122 R. Safaei, *Cancer Lett.*, 2006, **234**, 34–39.
- 123 G. Speelmans, W. M. Rutger, M. Staffhorts, K. Versluis, J. Reedijk and B. De Kruijff, *Biochemistry*, 1997, **36**, 10545–10550.
- 124 F. Lu, K. Wang, X.-Z. Sun, F. Xing, P.-D. An, Z.-H. Yang and J.-J. Yin, *Met.-Based Drugs*, 1995, **2**, 73–80.
- 125 S. J. Lippard and J. M. Berg, in *Principles of Bioinorganic Chemistry*, ed. University Science Books, California, 1994, p. 113.
- 126 J. J. Roberts and J. M. Pascoe, *Nature*, 1972, **235**, 282–284.
- 127 J. J. Roberts and A. J. Thomson, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1979, **22**, 71–133.
- 128 J. J. Roberts, *Adv. Inorg. Biochem.*, 1981, **3**, 274.
- 129 J. P. Caradona, S. J. Lippard, M. J. Gait and M. Singh, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 5793–5795.
- 130 J. R. Yachnin, I. Tallin, R. Lewensohn, F. Sirzén and H. Ehrsson, *Cancer Lett.*, 1998, **132**, 175–180.
- 131 A. Rodger, K. K. Patel, K. J. Sanders, M. Datt, C. Sacht and M. J. Hannon, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 3656–3663.
- 132 A. E. Egger, C. G. Hartinger, H. B. Hamidane, Y. O. Tsybin, B. K. Keppler and P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 10626–10633.
- 133 F. A. Blommaert, C. Michael, H. C. M. van Dijk-Knijnenburg, J. H. Schornagel, L. des Engelse and A. M. J. Fichtinger-Schepman, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1996, **38**, 273–280.
- 134 D. Pluim, M. Maliepaard, R. C. A. M. van Waardenburg, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, *Anal. Biochem.*, 1999, **275**, 30–38.
- 135 R. Gupta, J. L. Beck, M. M. Sheil and S. F. Ralph, *J. Inorg. Chem.*, 2005, **99**, 552–559.
- 136 M. J. P. Weleters, M. Maliepaard, A. J. Jacobs-Bergmans, R. A. Baan, J. H. M. Schellens, J. G. Ma, W. J. F. van der Vijgh, B. J. M. Braakhuis and A. M. J. Fichtinger-Schepman, *Carcinogenesis*, 1997, **18**, 1767–1774.
- 137 J. M. Woynarowski, J. S. Faivre, M. C. S. Herzig, B. Arnett, W. G. Chapman, A. V. Treviño, E. Raymond, S. G. Chaney, A. Vaisman, M. Varchenko and P. E. Juniewicz, *Mol. Pharmacol.*, 2000, **58**, 920–927.
- 138 B. Spingler, D. A. Whittington and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 5596–5602.
- 139 S. G. Chaney, S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu and M. Faldu, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1551–1559.
- 140 K. Jirsova, V. Mandys, W. H. Gispen and P. R. Bar, *Neurosci. Lett.*, 2006, **392**, 22–26.
- 141 D. H. Phillips, *Mutat Res.*, 1997, **378**, 1–12.
- 142 S. Hann, A. Zenker, M. Galanski, T. L. Bereuter, G. Stingeder and B. K. Keppler, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 581–586.
- 143 E. L. Meczes, A. Azim-Araghi, C. J. Ottley, D. G. Pearson and M. J. Tilby, *Biochem. Pharmacol.*, 2005, **70**, 1717–1725.
- 144 D. García Sar, M. Montes-Bayón, L. Aguado Ortiz, E. Blanco-González, L. M. Sierra and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 861–868.
- 145 D. García Sar, M. Montes-Bayón, L. Aguado Ortiz, E. Blanco-González, L. M. Sierra and A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 37–44.
- 146 G. Weber, J. Messerschmidt, A. C. Pieck, A. M. Junker, A. Wehmeier and U. Jaehde, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **380**, 54–58.
- 147 S. M. Kerr, T. Shoeib and B. L. Sharp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 2339–2348.
- 148 R. C. Le Pla, K. J. Ritchie, C. J. Henderson, C. R. Wolf, C. F. Harrington and P. B. Farmer, *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**, 1177–1182.
- 149 J. Reedik and J. M. Teuben, in *Cisplatin chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, ed. B. Lipperd, Wiley-VCH, Weinheim, Zürich, 1999, pp. 339–362.
- 150 M. Saroh, D. M. Kloth, S. A. Kadhim, J. L. Chin, A. Naganuma, N. Imura and M. G. Cherian, *Cancer Res.*, 1993, **53**, 1829–1832.
- 151 J. Holford, F. Raynaud, B. A. Murrer, K. Grimaldi, J. A. Hartley, M. Abrams and L. R. Kelland, *Anticancer Drug Design*, 1998, **13**, 1–18.
- 152 J. Holford, P. J. Beale, F. E. Boxall, S. Y. Sharp and L. R. Kelland, *Eur. J. Cancer*, 2000, **36**, 1984–1990.
- 153 S. J. Lippard and J. M. Berg, in *Principles of Bioinorganic Chemistry*, ed. University Science Books, California, 1994, p. 23.
- 154 R. Mandal, G. Jiang and X. F. Li, *Appl. Organomet. Chem.*, 2003, **17**, 675–681.
- 155 D. Hargman, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak and A. Souid, *Drug Metab. Dispos.*, 2003, **31**, 916–923.
- 156 G. van Vyncht, G. Bordin and A. R. Rodríguez, *Chromatographia*, 2000, **52**, 745–752.
- 157 D. Esteban-Fernández, B. Cañas, I. Pizarro, M. A. Palacios and M. M. Gómez-Gómez, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 1113–1121.
- 158 A. Pattanaik, G. Bachowski, J. Laib, D. Lemkuil, C. F. Shaw III, D. H. Petering, A. Hitchcock and L. Saryan, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 16121–16128.
- 159 M. Knipp, A. V. Karotki, S. Chesnov, G. Natile, P. J. Sadler, V. Brabec and M. Vasak, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 4075–4086.
- 160 R. Mandal and X. F. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 48–52.
- 161 P. D. Sadowitz, B. A. Hubbard, J. C. Dabrowiak, J. Goodisman, K. A. Tacka, M. K. Aktas, M. J. Cunningham, R. L. Dubowy and A. H. Souid, *Drug Metab. Dispos.*, 2002, **30**, 183–190.
- 162 B. A. Jansen, J. Brouwer and J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **89**, 197–202.
- 163 D. Hargman, J. Goodisman and A. K. Souid, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, **308**, 658–666.
- 164 J. C. Dabrowiak, J. Goodisman and A. K. Souid, *Drug Metab. Dispos.*, 2002, **30**, 1378–1384.
- 165 R. Miao, G. Yang, Y. Miao, Y. Mei, J. Hong, C. Zhao and L. Zhu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, **19**, 1031–1040.
- 166 A. Bernareggi, L. Torti, R. M. Facino, M. Carini, G. Depta, B. Casetta, N. Farrell, S. Spadacini, R. Ceserani and S. Tognella, *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, 1995, **669**, 247–263.
- 167 V. Calderone, A. Casini, S. Mangani, L. Messori and P. L. Orioli, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 1267–1269.
- 168 A. Casini, G. Mastrobuoni, C. Temperini, C. Gabbiani, S. Francesc, G. Moneti, C. T. Supuran, A. Scozzafava and L. Messori, *Chem. Commun.*, 2007, 156–158.
- 169 G. Yang, R. Miao, C. Jin, Y. Mei, H. Tang, J. Hong, Z. Guo and L. Zhu, *J. Mass Spectrom.*, 2005, **40**, 1005–1016.
- 170 A. Casini, C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, L. Messori, G. Moneti and G. Pieraccini, *ChemMedChem*, 2006, **1**, 413–417.
- 171 C. Gabbiani, A. Casini, G. Mastrobuoni, N. Kirshenbaum, O. Moshel, G. Pieraccini, G. Moneti, L. Messori and D. Gibson, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 755–764.
- 172 D. Gibson and C. E. Costello, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 1999, **5**, 501–510.
- 173 C. G. Hartinger, W. H. Ang, A. Casini, L. Messori, B. K. Keppler and P. J. Dyson, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 960–967.
- 174 C. G. Hartinger, Y. O. Tsybin, J. Fuchser and P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 17–19.
- 175 E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios and M. M. Gómez-Gómez, *Anal. Chem.*, 2009, **81**(9), 3507–3516.
- 176 J. Will, W. S. Sheldrick and D. Wolters, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 421–434.
- 177 D. E. Coling, D. Ding, R. Young, M. Lis, E. Stofko, K. M. Blumenthal and R. J. Salvi, *Hear. Res.*, 2007, **226**, 140–157.

II. OBJETIVOS / AIMS

OBJETIVOS

El cisplatino desempeña un papel fundamental en las terapias antitumorales. A pesar de los enormes esfuerzos dedicados en las últimas décadas al desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos con base de platino u otros metales, el cisplatino sigue siendo en muchos casos una opción irremplazable en el tratamiento de numerosos tumores, generalmente en combinación con otros fármacos. Sin embargo, sus mecanismos de acción antitumoral aún no son completamente comprendidos más allá de la formación de aductos con el ADN. Además, los efectos de resistencia producidos durante las terapias, que se traducen en una disminución en su efectividad, y los efectos tóxicos, que suponen una limitación a la dosis administrable del compuesto, especialmente la nefrotoxicidad inducida, son todavía serios problemas asociados, cuyas causas no son bien conocidas.

Es evidente que desde la Química Analítica puede contribuirse de forma notable a arrojar luz sobre estos aspectos problemáticos mediante el desarrollo de herramientas que permitan conocer la distribución del fármaco en el organismo y las interacciones que establece con biomoléculas, que pueden presentar una clara relación con sus efectos. Las metodologías analíticas deben afrontar grandes retos como la gran complejidad de las muestras, la baja concentración de los analitos y la necesidad de la conservación de la identidad de las especies metálicas a lo largo del proceso de análisis para su abordar su identificación, cuantificación y localización. La información proporcionada por estas metodologías podría traducirse en el diseño de terapias antitumorales mejoradas basadas en el conocimiento extraído desde el punto de vista mecanístico y en el desarrollo de protectores contra la toxicidad de cisplatino, particularmente de nefroprotectores, lo cual permitiría incrementar la dosis administrable del fármaco y, por tanto, su efectividad.

Considerando estos hechos, el objetivo de esta tesis es el desarrollo de métodos analíticos para la realización de estudios de metalómica en muestras biológicas derivadas de tratamientos con cisplatino y, en concreto, los siguientes objetivos particulares:

1. Desarrollo de metodologías analíticas sensibles y selectivas para la identificación de proteínas que ligan platino tras el tratamiento con cisplatino. Aplicación a muestras biológicas de relevancia clínica, en particular, relacionadas con los efectos nefrotóxicos del fármaco.

- Evaluación de las condiciones más adecuadas para la separación de complejos Pt-proteínas empleando métodos electroforéticos multidimensionales (2-DE), que permitan preservar los complejos.
 - Desarrollo de una metodología sensible para la detección de proteínas con platino tras su separación en geles electroforéticos.
 - Evaluación de las metodologías “*top-down*” y “*bottom-up*”, basadas en espectrometría de masas, para la detección, identificación y caracterización estructural de complejos Pt-proteínas, empleando modelos proteicos platinados. Estudio de la idoneidad de diferentes métodos de ionización, de fragmentación de complejos y de condiciones de digestión proteica, tanto en disolución como en gel (en el caso de la aproximación “*bottom-up*”).
2. Desarrollo de metodologías analíticas para la obtención de bioimágenes elementales en tejidos de riñón de organismos impactados con cisplatino con objeto de poner en relación la acumulación y distribución de Pt en el órgano con sus efectos sobre otros elementos, y el daño renal producido. Aplicación al estudio de estrategias nefroprotectoras.
 3. Estudio de cislstatina como posible nefroprotector para tratamientos con cisplatino. Valoración de su efecto sobre la eficiencia de llegada de cisplatino al interior celular y en particular al ADN, y de diversos parámetros bioquímicos relacionados con la capacidad de mejora en la supervivencia celular y la prevención de los efectos tóxicos en modelos celulares y animales tratados.

AIMS

Cisplatin plays a key role in anticancer therapies. Despite the great efforts made along the past decades to develop new alternative Pt/metal-based antineoplastic drugs, cisplatin is still an irreplaceable choice for the treatment of numerous tumors, usually in combination with other drugs. However, its antitumoral mechanism of action beyond its ability to form adducts with DNA is not completely understood. Moreover, resistance effects observed along the therapies, resulting in the decrease in its effectiveness, in addition to its side-effects that involve a limitation to the cisplatin dose that can be administered (especially nephrotoxicity) are still serious drawbacks with a not clearly defined cause.

There is no doubt that Analytical Chemistry can contribute to shed some light on the understanding of these problematic aspects, with the development of tools that may allow studying the distribution of the drug within the body and revealing its interactions with biomolecules, which can be connected with its effects. Such analytical methodologies need to be able to face great challenges such as the high complexity of the samples, the low analyte concentrations and the need to preserve the original metallic complexes along the steps involved in the sample treatments and analysis, in order to achieve their identification, quantitation and location. The information revealed by these methodologies could be useful for the design of improved antitumor therapies based on the knowledge produced from a mechanistic point of view and for the development of protectors against cisplatin-induced toxicity. In particular, the implement of nephroprotectors would allow increasing the drug maximum administrable dose and therefore, its effectiveness.

Considering these facts, the main aim of this thesis is the development of analytical methodologies for metallomics studies in biological samples from cisplatin treatments, and particularly the following objectives:

1. Development of sensitive and selective analytical methodologies for the identification of Pt-binding proteins after cisplatin treatments. Application to clinically relevant biological samples, especially those connected with the drug nephrotoxic effects.
 - Examination of the most appropriate conditions for the separation of Pt-protein complexes using multidimensional electrophoretic separation methodologies (2-DE), allowing the preservation of the complexes.

- Development of a sensitive methodology for the detection of Pt-proteins after their gel electrophoresis separation.
 - Evaluation of the MS-based “top-down” and “bottom-up” methodologies for the detection, identification and structural characterization of Pt-protein complexes, by using platinated model proteins. Studies of the suitability of different ionization and fragmentation methods for the analysis of the complexes, as well as examination of protein digestion conditions, both in-solution or in-gel (in case the bottom-up approach is applied) were carried out.
2. Development of analytical methodologies for elemental bioimaging in kidney tissue slices from animals treated with cisplatin, in order to find a connection between Pt accumulation and distribution in the impacted organ and its effect in other elements distribution and the renal damage caused. Application to the study of nephroprotective strategies.
 3. Study of cilastatin as a potential nephroprotector for cisplatin therapies. Evaluation of its effect on cisplatin cellular influx and particularly on its effective arrival to DNA in different cell types. Several biochemical parameters connected with the improvement in cell survival and the prevention of toxic effects in cell and animal models were also examined.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. ESTRATEGIAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON CISPLATINO

III.1. ESTRATEGIAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON CISPLATINO

Como se ha visto, con objeto de comprender los mecanismos de acción y de toxicidad del cisplatino, sería de gran relevancia la determinación de proteínas que son capaces de reaccionar con el fármaco. Más allá del desarrollo de métodos analíticos que permitan la identificación de proteínas coordinadas a platino, será necesario llegar a una información estructural que desvele los puntos de coordinación precisos del metal en la secuencia proteica. El hecho de que la interacción de cisplatino con una proteína pueda producir consecuencias desde el punto de vista biológico, como la pérdida de su funcionalidad, como sería el caso en que se modifique un centro activo enzimático, dependerá de la posición en la secuencia de la proteína en que se ligue el cisplatino.

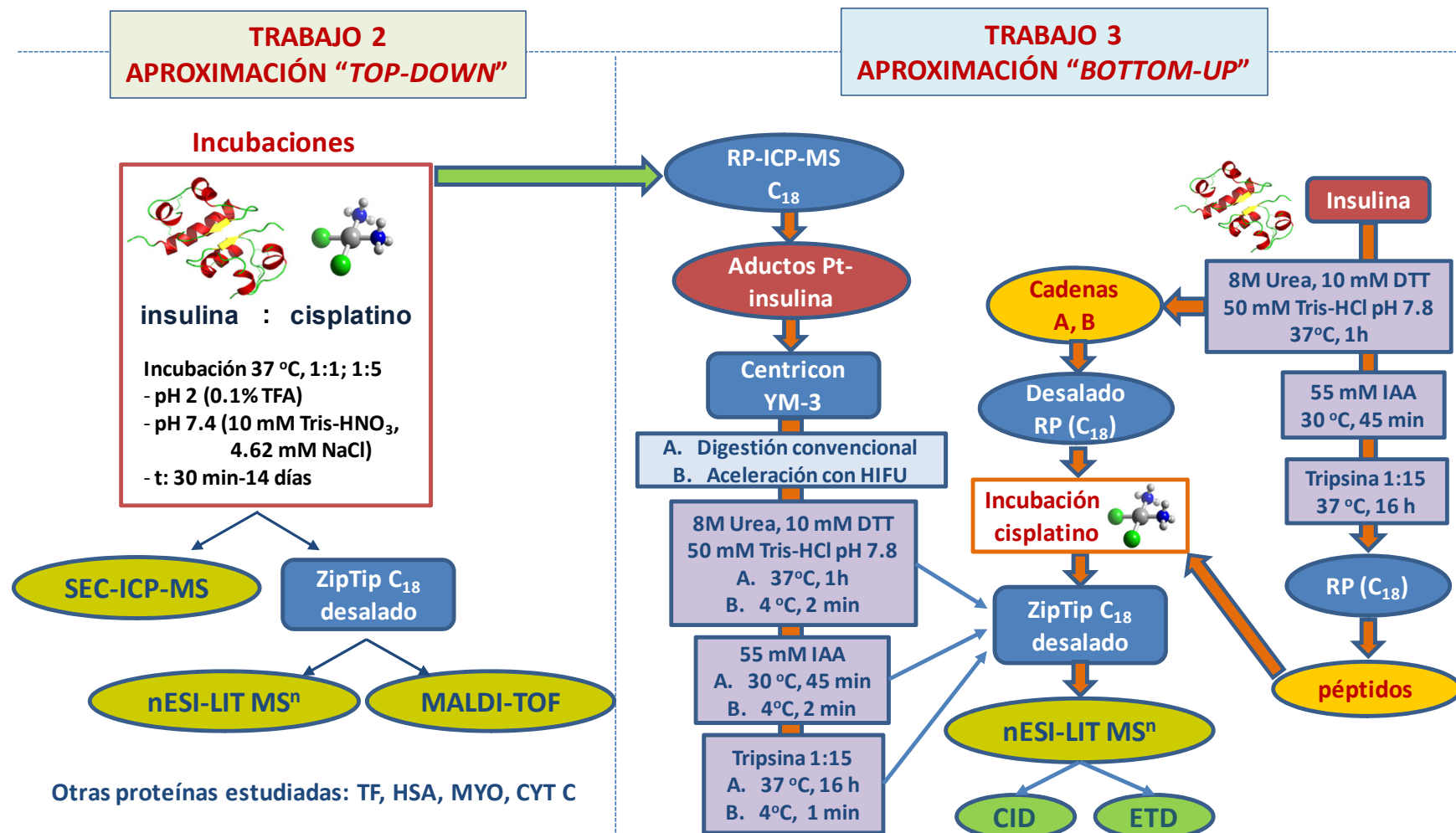
Las aproximaciones basadas en espectrometría de masas para el análisis en proteómica clásica plantean la determinación a nivel de proteína intacta (“*top-down*”) o a nivel de péptidos tras una digestión enzimática (“*bottom-up*”). Aunque ambas se han aplicado para el análisis de metaloproteínas, nunca se ha efectuado un estudio pormenorizado con objeto de comparar su aplicabilidad al análisis de complejos Pt-proteínas. Particularmente, sería interesante contrastar sus capacidades para ofrecer información estructural y coordinativa acerca del platino en la secuencia proteica y evaluar la resistencia de los enlaces proteína-metal durante las diferentes etapas de tratamiento de muestra previa al análisis, especialmente en el caso de las digestiones enzimáticas asociadas a la aproximación “*bottom-up*”.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para la evaluación de las metodologías mencionadas sobre un modelo proteico de insulina incubada con cisplatino, que se resumen en el Esquema 1. La insulina es una proteína de tamaño reducido (5.7 kDa) formada por dos cadenas unidas por dos puentes disulfuro, con un puente disulfuro intracadena, que presenta distintos posibles puntos de coordinación para el platino (N-terminal, His, (Cys)₂), por tanto, de cierta complejidad e interés para efectuar una evaluación metodológica. En el primer trabajo mostrado (Trabajo 2, “*Top-down mass spectrometric approach for the full characterization of insulin-cisplatin adducts*” *Analytical Chemistry* (2009), 81 (9), 3507- 3516) se exploró la aproximación “*top-down*” para la caracterización de los aductos Pt-proteínas formados. Para ello se prepararon incubaciones insulina-cisplatino en distintos medios de reacción ácido y fisiológico, para distintas relaciones proteína:fármaco y tiempos de incubación. Mediante el empleo del acoplamiento SEC-ICP-MS se constató la formación de especies platinadas como

consecuencia de la reacción de la insulina con el cisplatino. Posteriormente se realizaron análisis mediante MALDI-TOF y nESI-LIT MS, lo que permitió reconocer diversos tipos de complejos de insulina con platino, su dependencia de las condiciones y tiempo de incubación y la comparación de la influencia de ambos tipos de ionización en los resultados. Mediante la fragmentación de los complejos empleando CID-MSⁿ en la trampa de iones pudieron elucidarse diversos sitios de coordinación del cisplatino en la proteína. Además, se estudió la dependencia del estado de carga del ion molecular en las vías de fragmentación proteicas, y por tanto, en la información obtenible referente a la coordinación metálica. El reconocimiento del perfil isotópico modificado por platino es un aspecto fundamental en la detección y asignación tanto de aductos proteicos como de fragmentos platinados. Por otro lado, otras proteínas como TF, HSA, MYO o CYT C incubadas con cisplatino fueron también estudiadas aplicando esta aproximación fuera del contexto del trabajo 2.

En el Trabajo 3 (*“Novel insights into the bottom-up mass spectrometry proteomics approach for the characterization of Pt-binding proteins: The insulin-cisplatin case study”*, *Analyst* (2010), 135, 1288–1298) se examinan diversos aspectos de la aproximación “bottom-up” enfocados a su posible aplicación para la determinación de proteínas platinadas empleando el modelo proteico antes mencionado. En este caso, los complejos insulina-cisplatino generados *in vitro* se aislaron mediante HPLC(RP)-ICP-MS y se sometieron a los diversos tratamientos involucrados en las digestiones proteicas en disolución habituales durante la aproximación “bottom-up”, como: desnaturalización con urea, reducción de puentes disulfuro con DTT, alquilación de las cisteínas libres con IAA y digestión durante toda la noche (16 h) a 37 °C con tripsina. Los péptidos resultantes tras cada etapa se analizaron mediante nESI-LIT MSⁿ con objeto de evaluar la resistencia del enlace proteína-platino y de estudiar el grado de información obtenible en cuanto a puntos de coordinación del platino se refiere con la estrategia “bottom-up” en comparación con los generados con la “top-down” en el Trabajo 2. Además se comparó la información estructural proporcionada por distintos métodos de fragmentación como CID o ETD sobre distintos péptidos platinados con diversos estados de carga. También se evaluó la resistencia de los enlaces proteína-platino durante procesos de digestión enzimática acelerados mediante sonda de ultrasonidos (HIFU), método que ha sido propuesto en proteómica para producir digestiones enzimáticas en pocos minutos.³⁴⁸ Finalmente, con objeto de estudiar la reactividad frente a cisplatino de distintos residuos aminoacídicos se efectuaron incubaciones con cisplatino de las cadenas A y B y de péptidos generados a partir de insulina y se analizaron por nESI-LIT MSⁿ.

Esquema experimental 1



Trabajo 2

“Top-down mass spectrometric approach for the full characterization of insulin-cisplatin adducts”.

Analytical Chemistry (2009), 81 (9), 3507- 3516

Este trabajo fue presentado como Comunicación en formato Póster en la “Winter Conference on Plasma Spectrochemistry” celebrada en Graz (Austria) en Febrero de 2009.

Top-Down Mass Spectrometric Approach for the Full Characterization of Insulin–Cisplatin Adducts

Estefanía Moreno-Gordaliza, Benito Cañas,* María A. Palacios, and M. Milagros Gómez-Gómez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

The interaction of the antitumor drug cisplatin with insulin was studied using a top-down mass spectrometric approach. *In vitro* incubations were prepared under acidic and physiological conditions at different insulin/cisplatin molar ratios for different incubation times. Size exclusion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC–ICPMS) analysis enabled the specific detection of platinum containing species attributed to the binding of the drug to the protein. Further analysis through matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and nano-electrospray ionization mass spectrometry using a linear ion trap (nESI-LIT-MS) allowed the identification of platinated mono-, di-, and even triadducts in the incubations. Platinum binding sites were identified by CID-MSⁿ as B chain N-terminus, His5, and probably His10 residues, which turned out to be the same, regardless of the incubation conditions. Evidence on the binding of Pt to B chain Cys7 was also observed. Working with the LIT zoom scan mode provides enough resolution to discern the isotopic pattern for both precursor and fragment ions, allowing the differentiation of platinum-containing ions. The elucidation of platinum binding sites in a native protein through a top-down approach has been performed for the first time with this type of instrument.

Over the past decades, platinum drugs have been widely used for the treatment of numerous solid tumors.¹ Among these compounds, cisplatin (cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]), carboplatin, and oxaliplatin have been the most frequently used, being their antitumor activity due to their binding to nuclear DNA.² However, the high reactivity provided by the platinum atom makes these drugs prone to bind to other biomolecules they may encounter from the instant their administration intravenously takes place until they are eliminated. In fact, platinum drugs are known to bind to plasma proteins, such as albumin and transferrin, to a great extent.³ Although in some cases it has been proposed as an aid for the transport, cell uptake

process, and excretion, the interaction of these drugs with biomolecules involves a limitation in the amount of free drug available for exerting the antitumor activity.⁴ Besides, the interaction with proteins has been suggested to contribute to their side-effects, making the study of these interactions an issue of paramount importance. In this regard, the reactions between model proteins (albumin,⁵ transferrin,^{6,7} metallothionein,⁸ cytochrome C,⁹ ubiquitin,^{10,11} myoglobin,¹² and glutathione S-transferase¹³) and platinum-based drugs have been studied. Techniques as NMR, X-ray diffraction, and mass spectrometry have been recently used to establish a general trend in the reactivity, with special emphasis on the potential platinum binding sites in the proteins. In those previous studies, cysteine and methionine (S-donors) and histidine (N-donor) residues have been proposed as Pt binding sites.

A classical bottom-up mass spectrometric approach for the characterization of proteins involves their enzymatic digestion prior to their MS analysis.¹⁴ The use of such methodology in the study of metal-binding proteins may result in the partial loss of the platinum moiety, hampering the determination of the binding sites.¹⁵ Consequently, the study of platinum binding proteins using a top-down mass spectrometric approach is preferred. This has been once previously proposed, making use of high-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICR-MS) for the study of platinated ubiquitin.¹¹

Insulin is a small protein with two peptide chains (A and B) linked by two interchain disulfide bonds, containing another

* Corresponding author. Dr. Benito Cañas, E-mail: bcanas@quim.ucm.es. Fax: 0034913944329.

(1) Ozols, R. F. *Cancer Treat. Rev.* **1991**, *18*, 77–83.

(2) Sherman, S. E.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1153–1181.

(3) Esteban-Fernández, D.; Montes-Bayón, M.; Blanco González, E.; Gómez-Gómez, M. M.; Palacios, M. A.; Sanz-Medel, A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 378–384.

(4) Hargman, D.; Goodisman, J.; Dabrowiak, J. C.; Souid, A. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 916–923.

(5) Ivanov, A. I.; Christodoulou, J.; Parkinson, J. A.; Barnham, K. J.; Tucker, A.; Woodrow, J.; Sadler, P. J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14721–14730.

(6) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Coffey, J.; Johnson, N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 933–935.

(7) Khailaila, I.; Allardyce, C. S.; Verma, C. S.; Dyson, P. J. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1788–1795.

(8) Knipp, M.; Karotki, S. C.; Natile, G.; Sadler, P. J.; Brabec, V.; Vasak, M. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4075–4086.

(9) Yang, G.; Miao, R.; Jin, C.; Mei, Y.; Tang, H.; Hong, J.; Guo, Z.; Zhu, L. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 1005–1016.

(10) Hartinger, C. G.; Ang, W. H.; Casini, A.; Messori, L.; Keppler, B. K.; Dyson, P. J. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 960–967.

(11) Hartinger, C. G.; Tsybin, Y. O.; Fuchser, J.; Dyson, P. J. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 17–19.

(12) Gabbani, C.; Casini, A.; Mastrobuoni, G.; Kirshenbaum, N.; Moshel, O.; Pieraccini, G.; Moneti, G.; Messori, L.; Gibson, D. J. *Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 755–764.

(13) Calderone, V.; Casini, A.; Mangani, S.; Messori, L.; Orioli, P. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1267–1269.

(14) Kinter, M.; Sherman, N. E. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*; Wiley-Interscience: New York, 2000.

(15) Gibson, D.; Costello, C. E. *Eur. Mass Spectrom.* **1999**, *5*, 501–510.

intrachain cystine.¹⁶ It is synthesized in the pancreatic β -cells and participates in the regulation of blood glucose levels, being secreted in the bloodstream in order to activate the insulin receptors that trigger glucose metabolism. Its low molecular mass (5733.51 Da in bovine insulin) and the presence in its sequence of histidines and cysteines participating in disulfide bonds makes this protein an interesting model for studying its reaction toward cisplatin, something that has not previously been tackled.

Traditionally, molecular mass spectrometry has been a fundamental technique for the analysis of proteins and peptides. However, the implementation of an atomic technique such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) has become increasingly important for the analysis of metalloproteins. When it is coupled to a chromatographic separation, it provides complementary information to that offered by molecular MS, due to its high sensitivity and specific element detection.¹⁷

In this article, cisplatin has been incubated in vitro with insulin in various conditions and the resulting samples have been studied using different complementary, atomic and molecular, mass spectrometric techniques. Size exclusion chromatography coupled to ICPMS (SEC-ICPMS), matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and electrospray ionization-linear ion trap tandem mass spectrometry (ESI-LIT-MS/MS) have been used in a complete top-down approach for the detection, identification, and characterization of small platinum containing proteins. To our knowledge, this is the first time that a linear ion trap, more affordable than the high cost, high-resolution Orbitrap and FTICR mass spectrometry instruments, is used in a top-down approach for the characterization of platinum binding sites in a native protein.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Reagents. *cis*-Diamminedichloroplatinum (cisplatin) and insulin from bovine pancreas were purchased from Sigma Aldrich. NaCl (Panreac Química S.A.) and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (Fluka) were used for the preparation of the incubation solution under physiological conditions and for the mobile phase in the chromatographic analysis. High-purity nitric acid, used for the pH adjustment of the previously mentioned incubation media, was obtained by distillation of the analytical grade reagent (Merck, Darmstadt, Germany). Trifluoroacetic acid (TFA) and formic acid (HCOOH) were obtained from Fluka. HPLC grade acetonitrile (ACN) was purchased from Scharlab. Insulin oxidized B chain (bovine), insulin (bovine), and cytochrome C (equine), mass spectrometry standards used for calibrating MALDI-MS, were obtained from Sigma Aldrich. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix for MALDI was purchased from Fluka. Medium nanospray metal-coated borosilicate emitters were obtained from Proxeon (Odense, Denmark). All solutions were prepared with deionized water (Milli-Q Ultra-pure water systems, Millipore). A pH-meter (Crison) or pH indicator strips (pH 6.5–10, special indicator, Merck, Darmstadt, Germany) were used in order to control the pH of the solutions prepared.

In Vitro Incubations. Insulin (349 μ M) was incubated with cisplatin at different molar ratios: 1:1 and 1:5 at 37 °C, either in a

buffer containing 4.62 mM NaCl and 10 mM Tris-NO₃ pH 7.4 (reproducing the physiological intracellular saline and pH conditions) or in a pH 2 aqueous solution containing 0.1% TFA. Aliquots of these solutions were sampled at 30 min, 2, 4, 6, 16, 24, 48, and 96 h and 14 days for MS analysis. Control samples were also prepared by incubating insulin or cisplatin at 37 °C in the same conditions described. Samples were thoroughly shaken periodically.

SEC-ICPMS Analysis. The in vitro incubations were subjected to speciation studies by the coupling of a HPLC with an ICPMS. A high-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089), equipped with an injection valve (Rheodyne) was used as a sample delivery system. Separation of the molecules in the incubations was performed by size exclusion chromatography using a BioBasic SEC-60 column with an efficient separation range between 0.1–6 kDa (Thermo Scientific), using 10 mM Tris-NO₃ (pH 7.4) with 25 mM NaCl as the mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. For the specific Pt detection, the chromatographic system was hyphenated to a quadrupole ICPMS Thermo X-Series (Thermo Scientific, Windsford, Cheshire, U.K.) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fassel torch, and an impact bead quartz spray chamber cooled by a Peltier system. Single ion monitoring of m/z 194 (Pt) and 195 (Pt) was used to collect data. The instrumental parameters employed for ICPMS analyses were set as follows: forward power, 1250 W; plasma gas, 15 L min⁻¹ Ar; auxiliary gas, 7.3 L min⁻¹ Ar; nebulizer gas, 0.75 L min⁻¹ Ar; channels per atomic mass unit, 10; dwell time, 200 ms. Prior to the analysis, samples were diluted appropriately with mobile phase, filtered using a 0.22 μ m nylon filter, and injected with a 100 μ L sample loop onto the column.

nESI-LIT-MS/MS Experiments. A linear ion trap LTQ XL (Thermo Scientific, San Jose, CA) equipped with a nanoelectrospray (nESI) source from Proxeon (Odense, Denmark) was used for the ESI-MS/MS experiments. The instrumental parameters were tuned with a 2 μ M E-fibrinopeptide solution, prepared in 70% ACN, 0.1% HCOOH. During the analysis, the parameters were typically set to capillary temperature, 200 °C; capillary voltage, 30 V; tube lens, 105 V; spray voltage, 0.85 V. When incubated in acidic conditions, the protein–drug solutions were directly infused after a 1:10 dilution with 70% ACN, 0.1% HCOOH. A desalting step, required when dealing with salty samples or for unreacted cisplatin removal, was performed by microsolid phase extraction using ZipTips C₁₈ (Millipore), eluting the samples in 70% ACN, 0.1% HCOOH prior to the analysis. Collision induced dissociation (CID) was used for MSⁿ experiments. The isolation width of the precursor ions was selected as required, depending on the case, so that the whole isotopic pattern of the ion was included for the fragmentation. Typically, the conditions applied during the CID experiments were 35% collisional energy and an activation time of 30 ms. Spectra were acquired in the positive ion mode, over the m/z range 50–2000.

MALDI-TOF MS Analysis. A MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager DE-PRO, Applied Biosystems) was used to analyze the control preparation of insulin and the solution obtained after the incubation of insulin with cisplatin. The instrumental parameters were set as follows: detector, linear mode; accelerating voltage, 20 kV; grid, 95%; guide wire, 0.05; delay time, 500 ns;

(16) Ryle, A. P.; Sanger, F.; Smith, L. F.; Kitai, R. *Biochem. J.* **1955**, *60*, 542–556.

(17) Szpunar, J. *Analyst* **2005**, *130*, 442–465.

laser intensity, 2300. Acquisition was made in the m/z range 1500–15 000. A total of 100 shots were performed per spectrum, and six spectra were accumulated per sample in order to increase the S/N ratio. Spectra were acquired in the positive ion mode.

Samples were prepared following the dried droplet method, making use of a saturated solution of CHCA in 50% ACN, 0.1% TFA as matrix. Previously incubated samples were diluted 1:10 with 50% ACN, 0.1% TFA, and the resulting samples thoroughly mixed with the matrix solution at a 1:1 ratio. A volume of 1 μL of the mixture was deposited onto a stainless steel MALDI sample target and air-dried. Calibration was performed externally using the average masses of the singly charged ions produced by a solution containing 2.5 μM insulin oxidized B chain (3494.6513 Da), 2.5 μM insulin (5734.51 Da), and 5 μM cytochrome C (12 361.96 Da).

RESULTS AND DISCUSSION

Speciation Analysis by SEC–ICPMS. ICPMS was coupled to a chromatographic separation in order to perform a specific detection of platinum-containing species in the incubated samples. Differences on the evolution of the drug depending on the incubation conditions were evaluated using this hyphenated technique. Figure S-1 in the Supporting Information shows the SEC–ICPMS chromatograms for the evolution for 96 h of 1.8 mM cisplatin either in acidic or in physiological conditions. In a previous study,¹⁸ some of the peaks of cisplatin species analyzed under the same chromatographic conditions were assigned to the intact cisplatin (10.7 min), the monoquo- (14.7 min) and diaquo- (12.6 min) cisplatin species, and to a cisplatin dimer (26.5 min). In this case, aside from other less abundant unidentified peaks, all these species were observed and, remarkably, the most reactive aquo-complexes were found at higher concentrations in the acidic incubations.

Insulin/cisplatin mixtures (1:1 molar ratio) incubated for 96 h either in acidic or in physiological conditions were also analyzed by SEC–ICPMS in order to check if new platinum-containing species, different from those produced by the aqueous evolution of cisplatin, had emerged as a result of the binding of the drug to the protein. A new platinum-containing peak, absent in the cisplatin control samples, was detected in both incubations at a retention time of 5.7 min. However, for the incubations under acidic conditions, the new platinum-containing peaks were more abundant than those observed in physiological media. The higher reactivity between insulin and cisplatin in acidic conditions could be explained considering the different evolution of the drug.

Time-Dependent Evolution of Insulin–Cisplatin Incubations Studied by nESI-LIT-MS. The products of the reaction between insulin and cisplatin over the time were studied by nESI-LIT-MS, using the zoom–scan mode. Incubations were prepared at 1:1 and 1:5 (insulin/cisplatin) molar ratios using either acidic or physiological conditions. Ions were observed in the 50–2000 mass range and assigned to charge states between 3+ and 6+. However, the most abundant ions were those with charge states 4+ and 5+, as it is shown in Figure 1a. The recognition of platinum containing ions was based both on their mass values and on the characteristic isotopic pattern of the modified protein ions (Figure

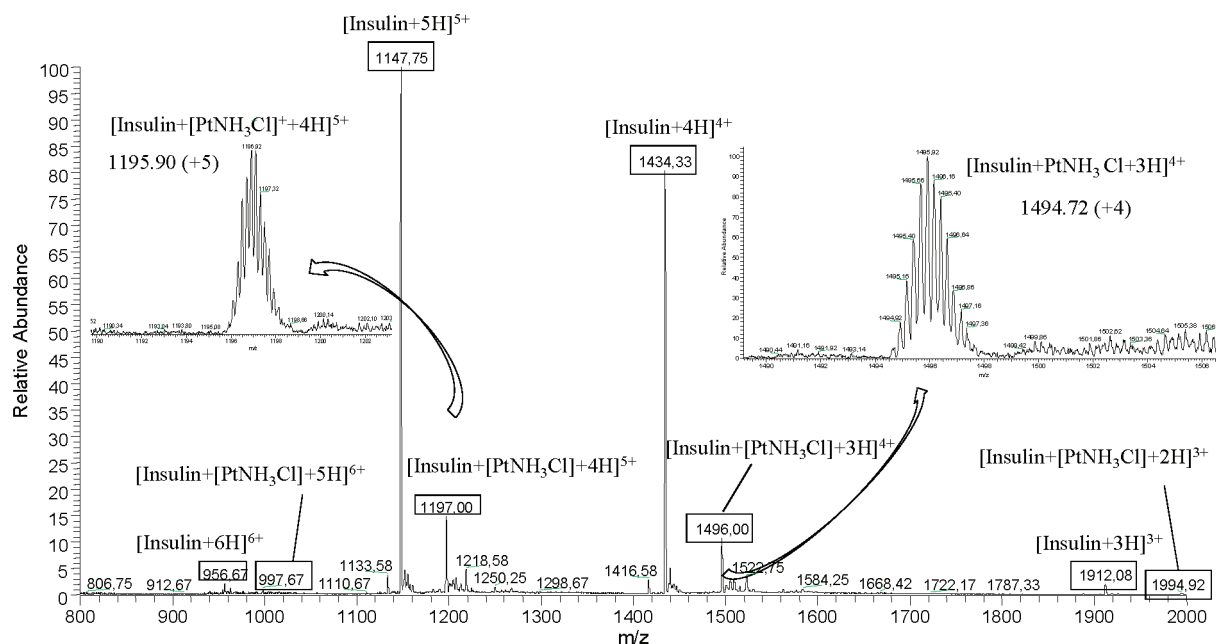
1b). It is important to highlight that signals for Pt-monoadducts were lower than those for the unreacted insulin, but their charge distribution was similar (Figure 1a). The most representative adduct peaks observed in all the incubations analyzed, based on their m/z and their isotopic pattern, are summarized in Table S-1 in the Supporting Information.

A relatively fast reaction between the drug and the protein was observed. After 30 min incubation in acidic conditions, monoadducts were detected in 1:5 and 1:1 samples (Figure 1a and Figure S-2a in the Supporting Information, respectively). Nevertheless, under physiological conditions, the reaction was slower and only after 2 h for the 1:5 incubations and 4 h in the case of 1:1 incubations were the monoadducts clearly recognized in the MS spectra (parts b and c of Figures S-2 in the Supporting Information, respectively). As it is expected, the reaction takes place to a greater extent with increasing incubation time and drug/protein ratio (Figures S-3 and S-4 in the Supporting Information). An evolution on the relative abundance and identity of the monoadducts observed takes place with time, being slightly different for the incubations in acidic or in physiological conditions. The main adduct observed during short-time incubations under acidic conditions corresponds to m/z of 1494.65 (4+) [insulin + $\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{Cl}$] (Figure 1a). However, at longer incubation times (24 h and onward), still in acidic conditions, a major monoadduct is observed with a m/z of 1498.9 (4+) [insulin + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}$] (Figure S-3 in the Supporting Information). The latter may be due to the attachment of a cisplatin molecule to insulin, followed by the loss of a Cl ligand. Nevertheless, for incubations under physiological conditions, the pattern was slightly different, the main adduct being the same observed at short times under acidic conditions, m/z 1498.9 (4+) [insulin + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}$] (Figure S-2c in the Supporting Information). In contrast, at longer times, the main adducts were 1489.88(4+) and 1494.14 (4+), corresponding to [insulin + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$] and [insulin + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{H}_2\text{O}$], respectively (Figure S-4 in the Supporting Information). Therefore, all the monoadducts consist of an insulin molecule bound to a platinum moiety, differing in the ligands from the original cisplatin structure that remain attached to it. These differences may reflect the number of coordination sites that the platinum may occupy in the insulin structure but may also be due, in some cases, to a partial ligand cleavage which may be occurring in the ionization source. In the case of physiological conditions, it seems that the monoquo-derivative of cisplatin reacts with the protein, losing the water residue and giving rise to a monodentated ligand. After a time, the latter may evolve to a predominantly bidentated ligand. For unknown reasons, ammine ligands in the platinated monoadducts in acidic conditions seem to be especially labile in the ion source at short times, in contrast to further evolved incubations.

As can be seen in Table S-1 in the Supporting Information, after 96 h, diplatinated adducts, and even triplatinated adducts, were detected in the incubations prepared under acidic conditions at a high molar ratio (1:5). This indicates the existence of several different platinum binding sites in the protein. However, abundant intact insulin ions were always observed in all the incubations, even in those cases where cisplatin was in excess, reflecting the limited reactivity of the drug toward the protein. This fact may be due to the nature of the potential binding sites in the protein, N-donor groups and S–S bonds, which may also be subject in

(18) Esteban-Fernández, D.; Cañas, B.; Pizarro, I.; Palacios, M. A.; Gómez-Gómez, M. M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1113–1121.

a)



b)

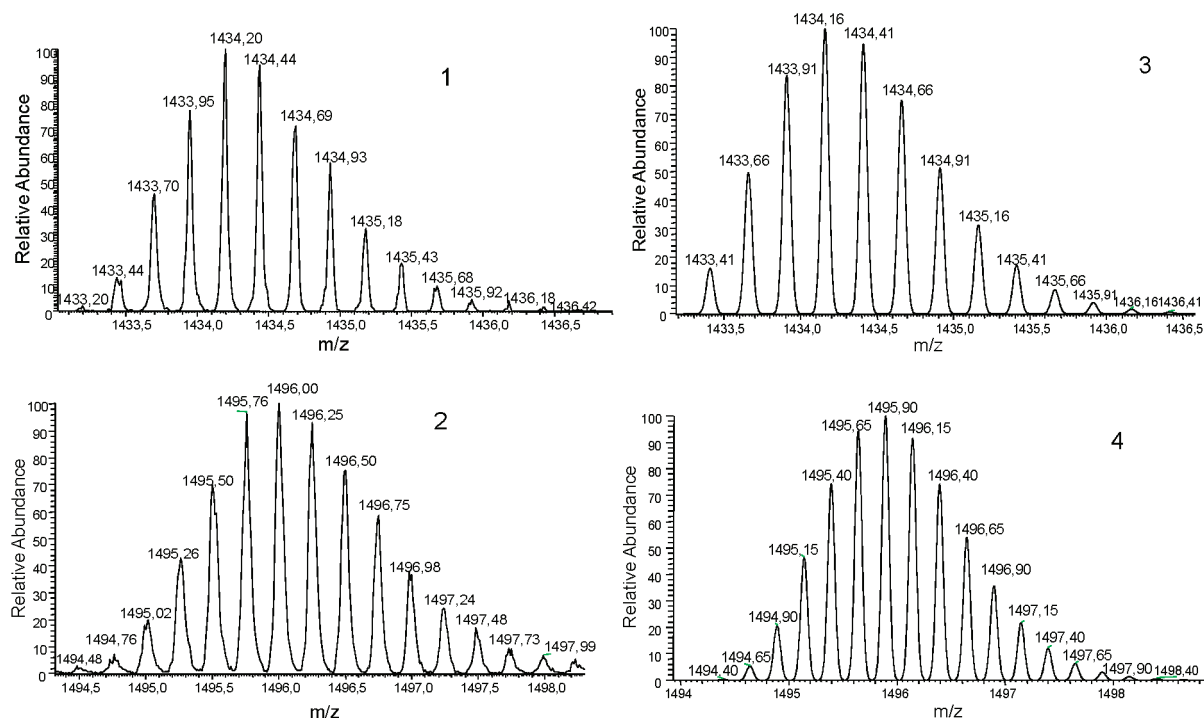


Figure 1. (a) nESI-LIT spectrum of a mixture of insulin and cisplatin (1:5) incubated for 30 min in 0.1% TFA at 37 °C. Ions, presenting a charge distribution ranging from 3+ to 6+, have been assigned as insulin ions and platinated monoadducts of insulin ions. Insets: Zoom scan of the 4+ and 5+ platinated monoadduct ions. (b) Ultrazoom scan for the (1) insulin ion with charge 4+ at m/z 1434.44, (2) platinated monoadduct ion with the same charge [insulin + PtNH_3Cl + 3H] $^{4+}$ at m/z 1494.76, and (3 and 4) the theoretical isotopic patterns are shown for comparison. The recognition of the platinated adducts was based on their characteristic isotopic pattern.

some way to steric hindrance. This was particularly noticeable in physiological conditions, where the reaction took place to a significant lesser extent (Figure S-4 in the Supporting Information). The observed different evolution of cisplatin depending on the incubation conditions may be of great influence too in the reactivity of the drug and could be the main reason for its limited binding toward insulin in physiological media.

The incubation of insulin with cisplatin in acidic conditions gave rise to the partial cleavage of the disulfide bonds linking the A and B chains, via exclusive S–S rupture. In this regard, peaks were visible in the mass spectrum after a 2 h incubation at 1:5 molar ratio (after 24 h at 1:1 molar ratio), corresponding to B chain (m/z , 849.96(4+)), A chain (m/z , 1167.94(2+)), and their respective monoplaminated adducts. It may be noted that they were

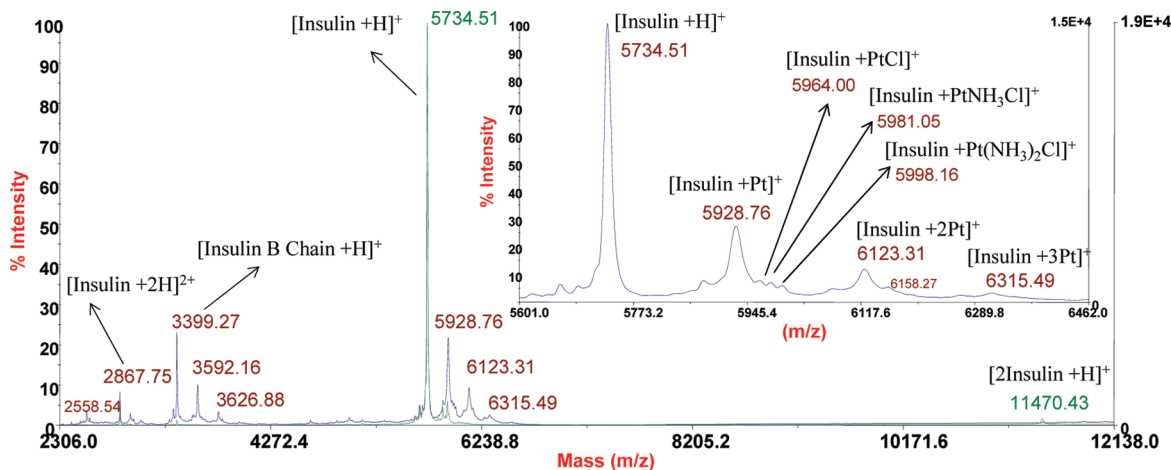


Figure 2. MALDI-TOF mass spectrum of a mixture of insulin and cisplatin (1:5) incubated for 96 h in 0.1% TFA at 37 °C (blue), overlaid with the native insulin control sample spectrum (green). Matrix: CHCA in 50% ACN, 0.1% TFA. Inset: expansion of the m/z 5543.0–6504.0 range corresponding to the insulin–cisplatin incubation. Complete assignments are shown in Table S-2 in the Supporting Information.

even doubly platinated after 96 h (Table S-1 in the Supporting Information). The intensity of all these peaks increased over time, becoming predominant after 14 days for the 1:5 incubations. The acidic cleavage of the control insulin does not seem to occur to a significant extent. Therefore, it can be inferred that the cleavage of disulfide bonds is favored in the presence of the platinum complex. This observation has been previously described¹⁹ and has been related to the coordination of platinum to the sulfur atoms followed by the cleavage of the S–S bond. However, no separation of the A and B chains due to S–S cleavage was observed in the incubation mixtures at physiological conditions. It only takes place in acidic conditions discarding that cleavage in the nESI source.

The stability of the samples after the desalting step performed prior to the nESI-MS analysis was also evaluated. It should be noted that the use of ZipTips for the cleanup of the samples provided a good recovery of the analytes. The desalting step did not significantly affect the metal–protein bond, and the stability of the binding was not altered on prolonged storage, at least for 15 days at –20 °C.

MALDI-TOF MS Analysis. The appropriateness of MALDI-based techniques for the analysis of the binding of metals to small proteins was studied using a sample of insulin/cisplatin in a molar ratio of 1:5, incubated in acidic conditions for 96 h. As it can be seen in Figure 2, the mass spectrum shows mainly singly charged insulin ions. Nevertheless, the doubly charged ion corresponding to insulin $[M + 2H]^{2+}$ and its dimer $[2M + H]^+$ could also be observed. Table S-2 in the Supporting Information summarizes the peaks observed in the spectra and their assignments. The MS spectrum of the protein–cisplatin mixtures provided peaks corresponding to different platinated insulin monoadducts, diadducts and triadducts, confirming the trend previously observed with nESI-MS. Yet, the relative intensity of the platinum containing peaks, compared to that of the intact insulin peak, seems to be lower than that produced by nESI-MS. Additionally, peaks attributed to the insulin B chain and its respective mono-, di-, and even triplatinated adducts were clearly observed, again confirming

the nESI-LIT-MS results. Furthermore, very small peaks corresponding to the insulin B chain, generated both by S–S or C–S cleavage, were observed when unreacted, control insulin was analyzed by MALDI-TOF MS. This suggests a slight contribution to the previously observed cleavage from the MALDI source.

It should be mentioned that the apparent relative intensities of the series of platinated adducts differ significantly from the ones observed in nESI-LIT-MS. In this case, the assignment of the major peaks would point out that insulin is attached to platinum atoms carrying no additional ligands. This odd observation has previously been described¹⁰ and is attributed to artifacts resulting from the favored loss of ligands from the platinum moiety during the highly energetic ionization process of MALDI. Therefore, the information provided by MALDI-TOF, concerning the characterization of the platinated adducts, is comparable to that offered by ESI-based techniques. However, it is misleading in regard to the ligands attached to the metallic center and the relative intensities of the metal containing ions compared to the intact protein ions.

nESI-LIT-MSⁿ CID Experiments. MSⁿ experiments with ESI produced ions were performed using CID in a linear ion trap instrument. Both the intact insulin ions and the platinated adduct ions were fragmented for comparison.

CID Fragmentation of the Intact Insulin Ions. The previously described²⁰ influence of the charge state of the precursor ions on the CID of insulin was confirmed. All the observed fragmentation pathways have been summarized in Figure 3. Under the applied instrumental conditions, all the observed insulin ions (charge distribution ranging from 3+ to 6+) undergo the fragmentation of the exocyclic chains by CID. This provides enough fragment ions to assign amino acid sequences from the N- and C-termini to the cysteines involved in the disulfide bonds. In the case of low-charge ions (up to 4+), CID produced the cleavage of the disulfide bonds, giving rise to the separation of the insulin A and B chains through the rupture of the S–S or C–S bonds, following the pathways described in the literature.²¹ For highly charged insulin ions (from 5+ onward), the fragmenta-

(19) Wei, H.; Wang, X.; Liu, Q.; Mei, Y.; Lu, Y.; Guo, Z. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 6077–6081.

(20) Wells, J. M.; Stephenson, J. L.; McLuckey, S. A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *203*, A1–A9.

(21) Lioe, H.; O'Hair, R. A. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1109–1123.

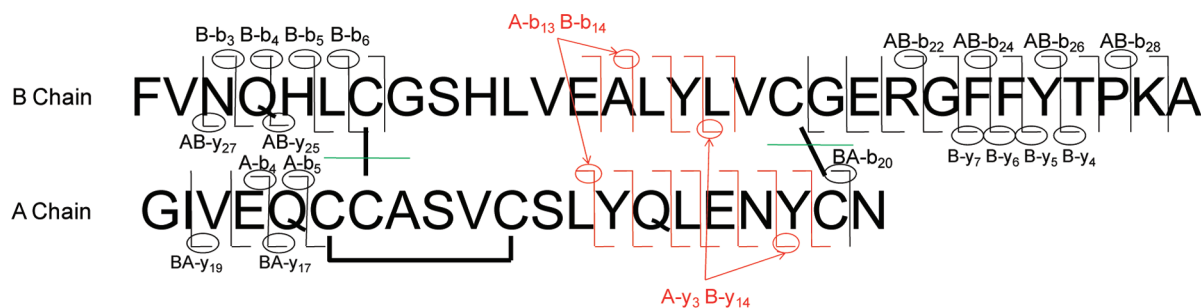


Figure 3. Insulin sequence showing the schematic CID fragmentation pattern observed experimentally. The folded segments indicate the observed fragmentation along the sequence. When incomplete, the corresponding ion was missing. Black: observed fragmentation of the exocyclic chains. Green: disulfur bonds cleavage, exclusively observed in the fragmentation of the low charged ($\leq 4+$) insulin ions. Red: fragmentation of the endocyclic chains exclusively observed for the highly charged ions ($\geq 5+$). This latter fragmentation can only be detected when it takes place simultaneously on both chains. To clarify the nomenclature used further on for fragment ions, some examples have been assigned on the figure. Nomenclature: A- y_x , y_x fragment from the A chain; A- b_x , b_x fragment from the A chain; B- y_x , y_x fragment from the B chain; B- b_x , b_x fragment from the B chain; AB- y_x , y_x fragment from the B chain linked to the entire A chain through disulfide bonds; BA- y_x , y_x fragment from the A chain linked to the entire B chain through disulfide bonds; AB- b_x , b_x fragment from the B chain linked to the entire A chain through disulfide bonds; BA- b_x , b_x fragment from the A chain linked to the entire B chain through disulfide bonds; A- y_z B- y_x , y_z fragment from the A chain linked to a y_x fragment from the B chain through disulfide bonds; A- b_z B- b_x , b_z fragment from the A chain linked to a b_x fragment from the B chain through disulfide bonds.

tion pathways were more complicated, although the cleavage of disulfide bonds was not observed. Instead, a variety of fragments resulting from the simultaneous cleavage in two positions of the endocyclic part of both A and B chains, keeping interchain S–S bonds, was produced. This fact, added to the wider range of charge states in the fragment ions generated from high-charge precursor ions, makes the interpretation of the MS/MS spectrum especially difficult. It is therefore important to take into account the described influence of the charge state in the fragmentation of insulin ions, in order to design a strategy for tackling the study of platinated-insulin adducts and to understand the MSⁿ spectra they may provide.

Determination of Platinum Binding Sites in Insulin through CID MSⁿ Experiments. In order to determine the platinum binding sites within the insulin molecule, the platinated adducts observed along the MS experiments were subjected to MSⁿ through CID fragmentation. In the case of insulin, the expected potential binding sites consist of the abundant S-donor cysteines: A chain Cys6, Cys7, Cys11, Cys20, B-Chain Cys7, Cys19, all of them participating in disulfide bonds; the N-donor groups on the B chain His5, His10; and both chains N-terminus. The detection of platinum-containing fragments was based on their peculiar isotopic pattern.

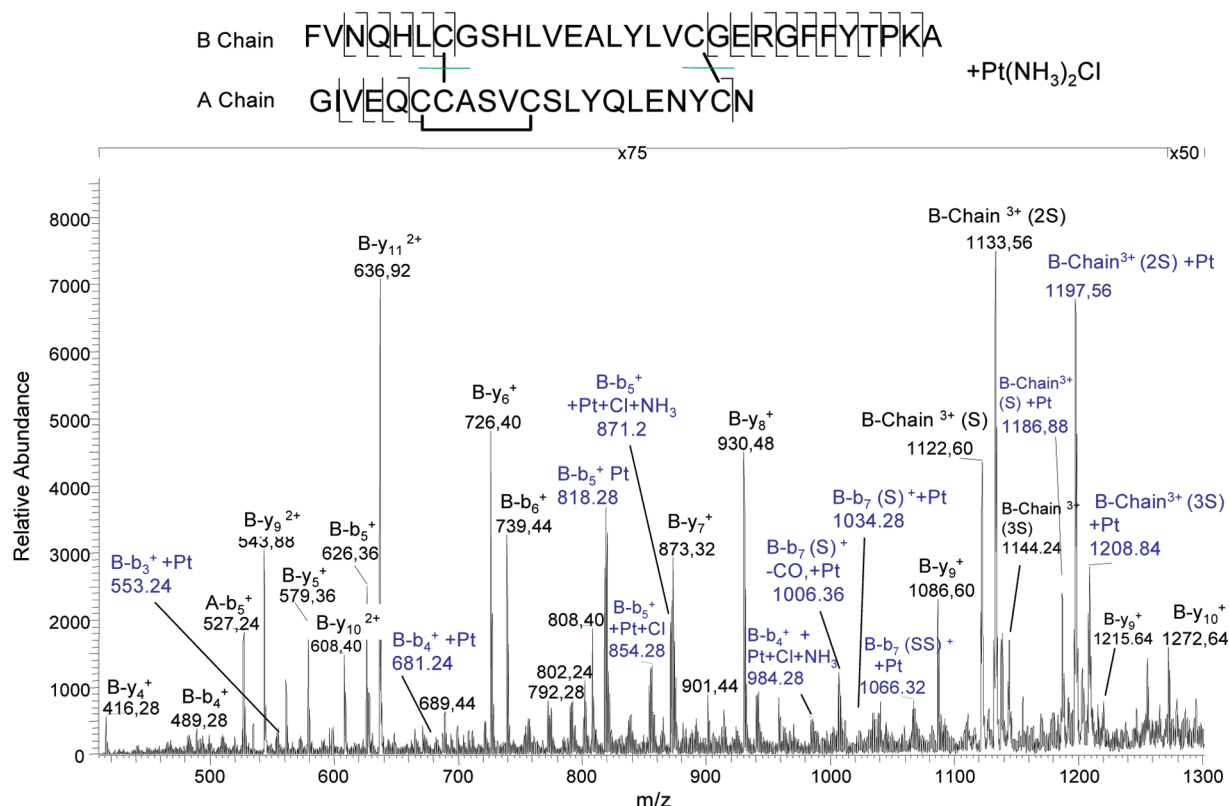
All the platinated monoadducts fragmented produced an almost identical mass spectra, when carrying the same charge. Only subtle differences, due to the presence in some of the fragment ions, of different ligands (chloride or ammonia) from the precursor ions were found. This was the case, for instance, for MS² of monoplaminated peaks at m/z 1498.99(4+), 1494.72(4+), 1485.94(4+), and 1482.38(4+). This may indicate that all these different monoadducts are due to the attachment of platinum to the same sites, with only minor variations owing to the number of ligands coordinated to the metal. However, many platinum-containing fragments produced in the MS² of the previous adducts were observed to lack those ligands, probably lost during the fragmentation process. Remarkably, the CID fragmentation pattern of platinated insulin ions has the same dependence on the charge as the intact insulin ions.

CID MS² experiments were carried out on the 4+ and 5+ ions of monoplaminated adducts (Figure 4, Figure S-5 in the Supporting Information). Small Pt containing fragment ions were observed in both cases at m/z 553.24(1+) and 681.24(1+) (Figure 5a,b). These correspond to the b-type fragments (FVN – Pt)⁺ and (FVNQ – Pt)⁺, respectively, involving the loss of ammine and chloride ligands and of a proton from the original structure. Those fragments are proof of the attachment of the platinum moiety to the B chain NH₂-terminus. At the same time, another high-intensity fragment ion with a platinum isotopic pattern was detected at m/z 818.28 (+1) (Figure 5c). This fragment was isolated and subjected to subsequent fragmentation by CID (MS³) (Figure 6). On the basis of the assignment of the subfragment ions produced, this latter experiment confirmed the identity of the ion as (FVNQH + Pt)⁺ and revealed mainly His5 and, to a lesser extent, the NH₂ terminus of the insulin B chain as the platinum binding sites.

CID MS² of 4+ and 5+ monoplaminated insulin ions (Figure 4 and Figure S-5 in the Supporting Information) also produced fragment ions corresponding to the sequences GIVEQ (within the A chain) and GERGFFYTPKA (within the B chain). However, no platinum was found in the fragment ions involving those sequences, while the rest of the protein kept the platinum after their loss. Therefore, the attachment of the platinum moiety to the Arg22 or to the N-terminus of chain A was not observed, and its hypothetical binding would not occur to a significant extent. Interestingly, the b-ions produced by the sequence FVNQHL were also found without platinum, together with y-ions corresponding to the rest of the protein keeping the Pt moiety after the loss of the previous sequence. All those observations suggest that the platinum may also be located somewhere inside the cyclic disulfide-delimited region of the protein.

For charge states up to 4+, CID of monoplaminated insulin ions also produced a series of fragment ions in which S–S/C–S bond cleavages took place. As a consequence, the fragmentation of the platinated insulin ions (1498.99, 1494.72, 1485.94, 1482.38(4+)) gave rise to additional small platinum-containing fragments (m/z

a)



b)

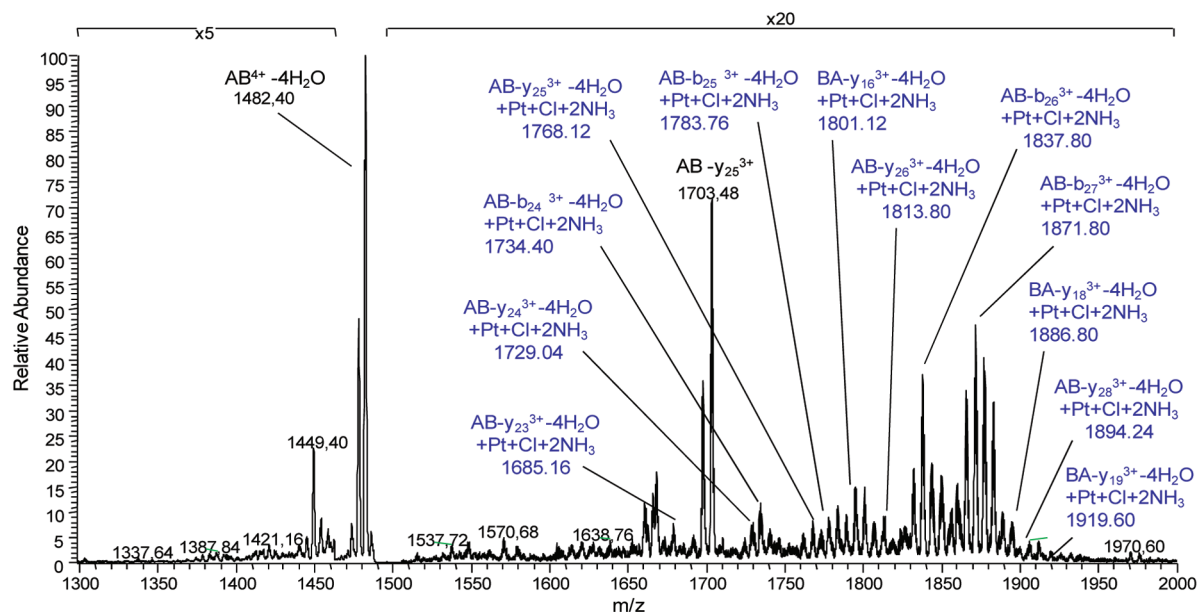


Figure 4. CID MS/MS for the 4+ ion at m/z 1498.90 observed in the mixture of insulin and cisplatin (1:5) incubated in 0.1% TFA for 16 h at 37 °C. (a) The m/z 400–1300 range. (b) The m/z 1300–2000 range. The amino acid sequence of the precursor ion and the fragmentation pattern observed are represented above. The most relevant platinum-containing fragments and insulin fragments without platinum have been assigned in blue and black, respectively, together with their m/z . The nomenclature used has been explained in Figure 3. The number of sulfur atoms that remain after the S–S bond cleavage is in parentheses.

$z1066.32(1+)$, $1034.28(1+)$, $1006.36(1+)$, Figure 5g–i). Those fragment ions were identified as b-type ions: (FVNQHLC* + Pt)⁺ (C* represents a cysteine conserving both S atoms from the original cysteine), (FVNQHLC + Pt)⁺, and the CO loss (–28) from the latter, respectively. Further CID (MS³) of these fragments

confirmed His5 as a platinum-binding site (Figure 7). MS³ of $1006.28(1+)$ also produced an abundant peak at m/z 518.16(1+), attributed to HLC + Pt. Strikingly, MS⁴ of the latter (Figure S-6 in the Supporting Information) suggested a possible location of the platinum moiety at the Cys7 residue additionally to the His5.

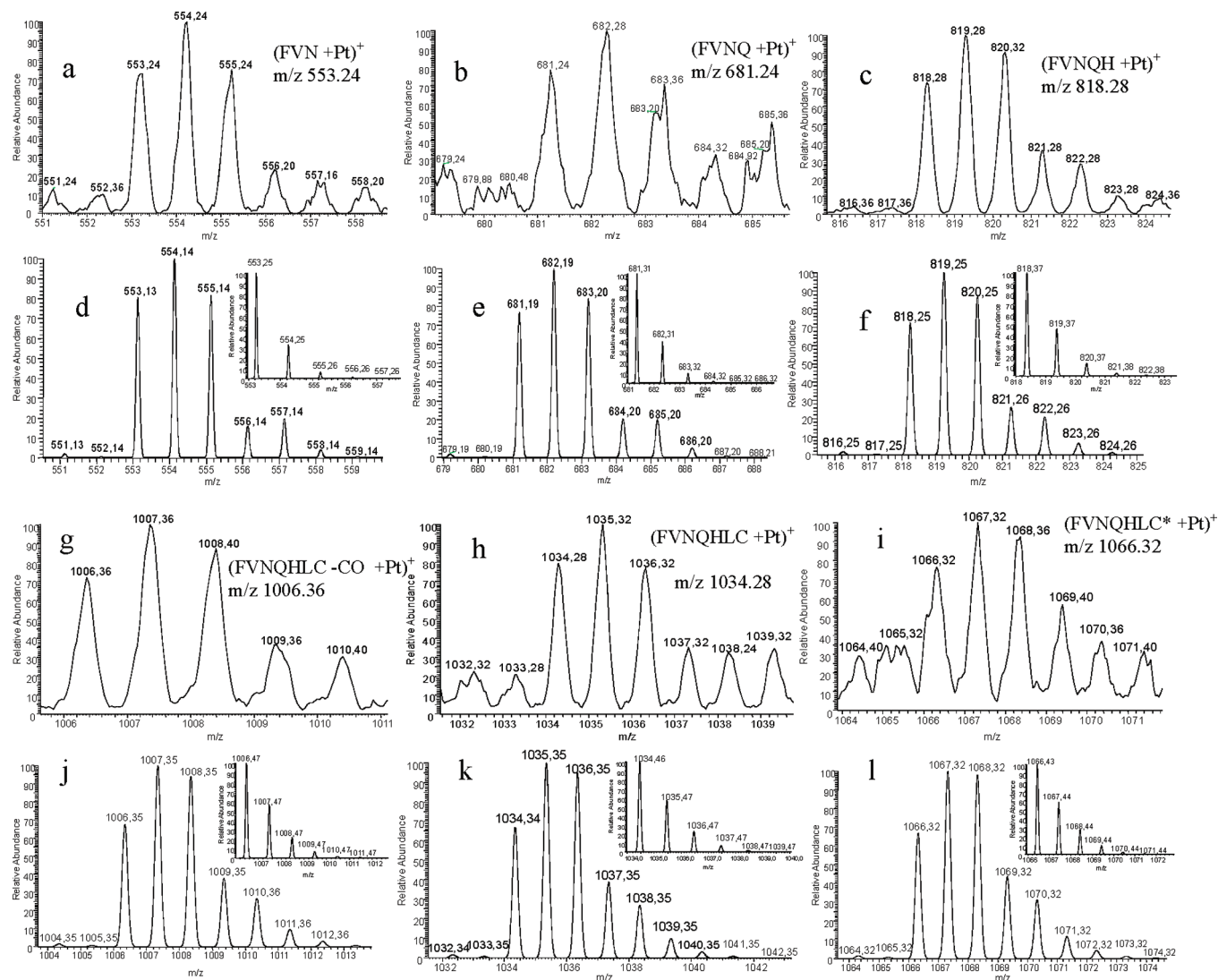


Figure 5. (a, b, c, g, h, i) Platinum-containing fragment ions observed in the CID MS/MS experiment performed on the 1498.90 (4+) ion and (d, e, f, j, k, l) theoretically calculated isotopic patterns. Insets: theoretically calculated isotopic pattern for nonplatinated peptides sharing the same mass are shown for comparison. C* represents a cysteine conserving both sulfur atoms from the original cystine.

This would imply that the coordination of platinum to a cystine would also be possible.

As stated earlier, CID of the low-charge platinum–insulin adducts (3+ and 4+) produces the separation of the A and B chains. MS² spectra of precursor ions from monoplaminated adducts with m/z 1498.99, 1494.72, 1485.94, and 1482.38, all with a charge of 4+, also gave rise to fragments at m/z 1111.20, 1122.60(3+), 1133.60(3+), 1143.90(3+), and 1155.08(3+). These correspond to B chain ions without Pt and differ in the number of sulfur atoms they have. Nevertheless, fragment ions at m/z 1187.20(3+), 1197.88(3+), 1208.88(3+), and 1219.52(3+) were also observed in the MS² spectra and were assigned as the monoplaminated B chain, containing different S atoms (Figure 4a). Apparently, the relative intensity of the fragments generated by the cleavage of disulfide bonds in the gas phase was higher in the case of platinated insulin than for the nude insulin. That could be explained with the suspected tendency of metals coordinated to disulfide bonds to enhance the disulfide cleavage pathway in the gas phase.²²

MS³ of the 1197.88(3+) fragment ion (Figure S-7 in the Supporting Information) depicted again His5 as a binding site for Pt (a subfragment was observed at 818.20(1+)), but subfragments pointing to Cys7 (518.16(1+), 1006.28(1+), and 1425.5(2+), corresponding to the platinated subsequence CGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA), were also found. Considering that the subsequence GERGFFYTPKA does not carry the Pt moiety, His10 would be another possible candidate for the binding of cisplatin, aside from the cysteines, but it can only be speculated.

CID fragmentation of the 5+ and 6+ monoplaminated insulin adduct ions induced endocyclic cleavage in both the A and B chains, producing fragments that kept the S–S bonds intact. MS² of the 5+ precursor ions with a m/z of 1200.28, 1197.10, and 1186.08 (Figure S-5 in the Supporting Information) generated fragments containing the unplatinated sequence LVCGERGFFYTPKA-YQLENYCN (m/z 992.48(2+)). In contrast, fragment ions containing the sequence FVNQHLGSHLVEALY-GIVEQCAS-

(22) Lioe, H.; Duan, M.; O'Hair, R. A. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2727–2733.

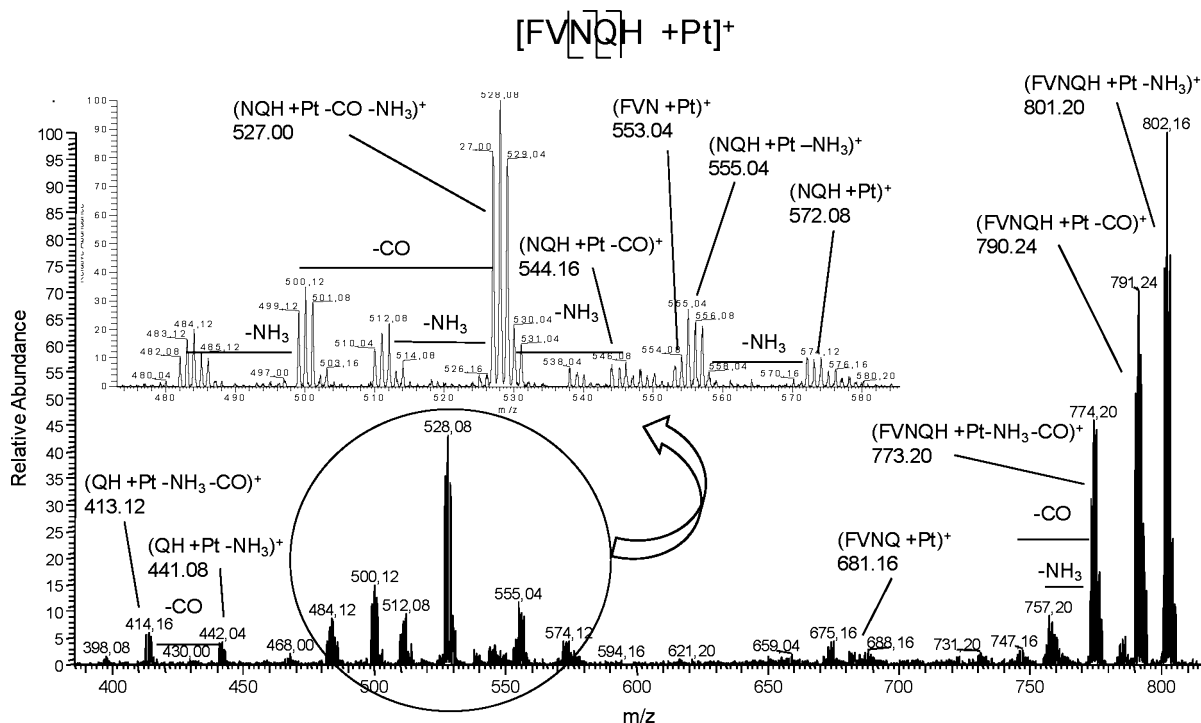


Figure 6. CID-MS³ for the platinum-containing ion at m/z 818.24(1+) observed in the MS² of the platinated monoadduct at m/z 1498.90(4+). [Transition: 1498.9(4+) \rightarrow 818.24(1+)]. The sequence of the precursor ion and the most relevant fragment ions observed are shown.

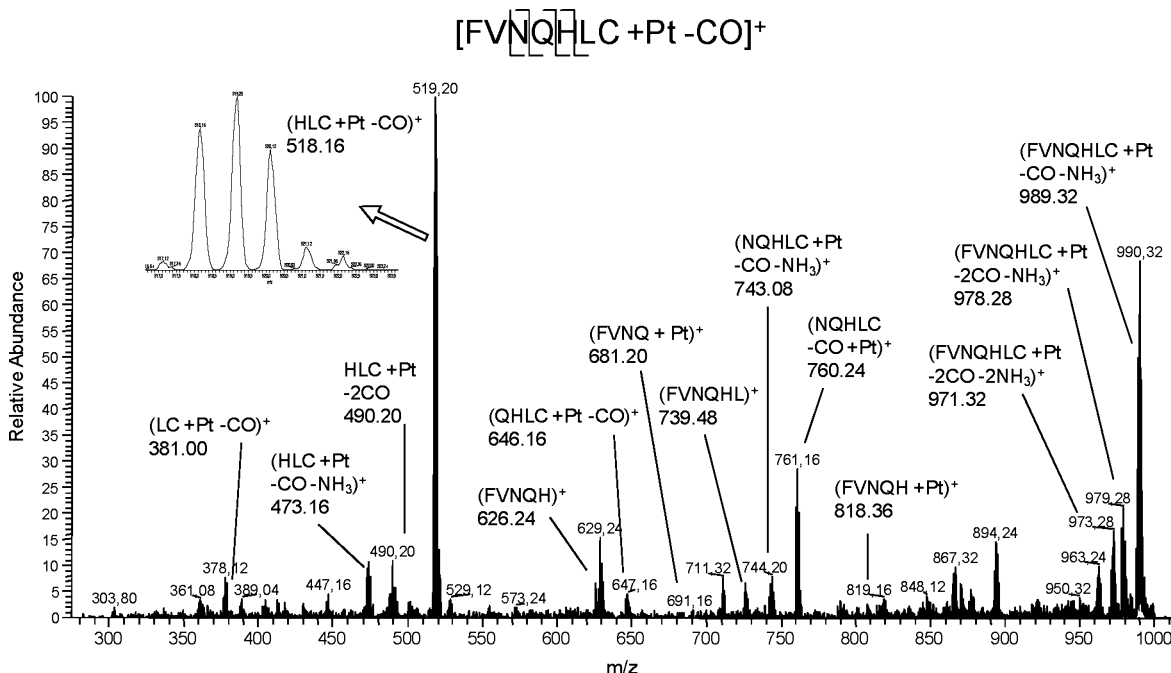


Figure 7. CID-MS³ for the platinum containing ion at m/z 1006.36(1+) observed in the MS² of the 1498.90(4+) platinated monoadduct ion [transition: 1498.9(4+) \rightarrow 1006.36(1+)]. The sequence of the precursor ion and the most relevant fragment ions observed are represented.

VCSL (m/z 1646.72(2+)) were exclusively observed with platinum. This fact confirms the previously mentioned overall location of platinum within the protein and discards, to a significant extent, the binding of platinum to the disulfide involving B chain Cys19 and A chain Cys20.

CID fragmentation of some of the doubly platinated insulin precursor ions led to similar observations to the data provided by MS² spectra from ions corresponding to monoplated

insulin. For the diplatinated-insulin ions, 1266(5+) or 1553.22(4+), MS² produced the same platinum containing fragments previously observed: 553.24(1+), 681.24(1+), 818.28(1+), 871.2(1+), 984.28(1+), and 1006.36(1+). Interestingly, in the case of MS² of 1553.22(4+), a fragment containing two platinum atoms was observed at 1243.36(1+), corresponding to $[FVNQHLC + 2Pt + NH_3]^+$. Moreover, the disulfide cleavage induced under these conditions gave rise to nonplatinated insulin B chain ions but

also to mono- and diplatinated species, suggesting the possibility of the simultaneous presence of two platinum atoms in the B chain (data not shown).

CID-MS² experiments were also performed on the platinated insulin B and A chains generated in the incubations under acidic conditions. MS² of platinum-containing B chain, 898.78(4+), gave rise to fragment ions at 818.28(1+), 1006.36(1+), and 1066.32(1+), pointing out His5 and Cys7 again as possible coordination sites. Another interesting fragment ion at 1578.48(1+) is probably due to the sequence CGSHLVEALYLVC attached to a platinum atom. The loss of the sequence GERGFFYTPKA (Pt free) from the precursor ion produced another fragment ion at 1158.92(2+) that was subjected to further MS³. In this case, the previous findings were confirmed and also some new subfragment ions might indicate the additional hypothetical binding to the Cys19, something not observed in the platinated whole protein. On the other hand, CID-MS² of platinum-containing insulin A chain, 1298.88(2+), produced platinum-containing fragments at *m/z* 644.20(1+), 753.28(1+), and 772.28(1+). These would indicate the possible binding of Pt to the A chain N-terminus, something not found in the platinated native protein.

Mixtures of insulin with cisplatin were studied over a long period of time (96 h), and a comparison was made between the MSⁿ spectra provided by the same platinated adduct ions observed at different incubation times. No change in the MSⁿ spectra acquired was observed, and therefore, the binding sites remained unchanged. In light of the results, the B chain N terminus, His5 and probably His10, appear in insulin as equally favorable binding sites, in contrast to the A chain N-terminus. Surprisingly, despite the abundance of cysteines (as cystines) in the protein, the coordination of platinum to the cysteines participating in S–S bonds does not seem to be the most favorable process, although the involvement of position Cys7 seems to be proved by the fragments produced in the MS⁴ experiments. These results disagree with those previously reported²³ for insulin oxidized B chain suggesting a main binding to the N-terminus above the binding to histidines.

All the incubations prepared, either in excess or not of cisplatin and either in acid medium or at physiological conditions, provide the same fragmentation pattern for the adducts produced and,

thus, the same results on the platinum binding sites. This fact suggests that there is no influence of the conditions of the media (pH, saline content) on the platinum binding sites on insulin. The only significant difference lies in the kinetic aspects of the reaction between the drug and the protein and its extent.

CONCLUSIONS

SEC–ICPMS has been proved to be a useful technique for the separation and detection of platinum containing species obtained *in vitro*. MS/MS experiments using nESI-LIT demonstrated that the reaction between cisplatin and insulin begins quickly and does not seem to occur specifically in a single site but involves several possible binding sites. The detection of platinated monomers, dimers, and trimers in the incubations also confirmed this fact. In addition, the catalytic effect of platinum complexes toward the cleavage of disulfide bonds in proteins in acidic conditions has also been demonstrated.

MALDI-TOF has proved itself not to be the best technique for analyzing metalloproteins due to the excessively energetic ionization process it involves compared to ESI-based techniques, leading to the loss of labile ligands during the analysis. To sum up, a top-down mass spectrometric approach based on SEC–ICPMS, MALDI-MS, and ESI-MS/MS has been proved to be effective for the complete characterization of a small metal-binding protein in substitution of a bottom-up methodology that could induce the loss of the metal moiety bound to the protein during the enzymatic digestion typically performed. The resolving power of zoom–scan in a linear ion trap is enough for these small proteins, making unnecessary the use of instruments that, like an Orbitrap or a FTICR-MS, are more inaccessible.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been financially supported by the Spanish CICYT Projects CTQ-2005-08593 and CTQ-2008-04873. E.M.-G. acknowledges the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for a FPU predoctoral fellowship.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review January 8, 2009. Accepted March 10, 2009.

AC900046V

(23) Hong, J.; Miao, R.; Zhao, C.; Jiang, J.; Tang, H.; Guo, Z.; Zhu, L. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 1061–1072.

Top-down mass spectrometric approach for the full characterization of insulin-cisplatin adducts

Estefanía Moreno-Gordaliza, Benito Cañas*, María A. Palacios, M. Milagros Gómez-Gómez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, E-28040 Madrid, Spain

* Corresponding author: Dr. Benito Cañas e-mail: bcanas@quim.ucm.es, fax: 0034913944329

SUPPORTING INFORMATION

The present document provides further information on the paper mentioned above.

Contents:

- Tables S-1 and S-2
- Figures S-1 to S-7

Table S-1. Insulin and cisplatin were incubated in either acidic or physiological conditions at 1:5 and 1:1 molar ratios. The masses of the most relevant peaks observed by nESI-LIT-MS are shown.

INSULIN-CISPLATIN INCUBATIONS – ACIDIC AND PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

- Monoadducts

Assignment	Observed maximum m/z	Observed monoisotopic m/z	Calculated monoisotopic m/z
[Insulin + 4H] ⁴⁺	1434.33	1433.46	1433.41
[Insulin + Pt+2H] ⁴⁺	1482.38	1481.38	1481.39
[Insulin + [Pt NH ₃] ₂ +2H] ⁴⁺	1486.90	1485.94	1485.65
*[Insulin + [Pt (NH ₃) ₂]+2H] ⁴⁺	1490.84	1491.66	1491.64
**[Insulin + [Pt Cl] ₂ +3H] ⁴⁺	1491.90	1490.40	1490.39
*[Insulin + [Pt(NH ₃) ₂ H ₂ O]+2H] ⁴⁺	1495.40	1494.40	1494.41
[Insulin + [Pt NH ₃ Cl] ₂ +3H] ⁴⁺	1496.16	1494.72	1494.65
[Insulin + [Pt(NH ₃) ₂ Cl] ₂ +3H] ⁴⁺	1500.14	1498.99	1498.90

* Exclusively observed under physiological conditions

** Exclusively observed under acidic conditions

INSULIN-CISPLATIN INCUBATIONS – ACIDIC CONDITIONS

- Diadducts

Assignment	Observed max. m/z	Calculated max. m/z
[Insulin + 2 Pt] ⁴⁺	1530.94	1530.88
[Insulin + 2 Pt + NH ₃] ⁴⁺	1535.20	1534.89
[Insulin + 2 Pt + Cl + 1H] ⁴⁺	1539.72	1539.88
[Insulin + 2 Pt + NH ₃ + Cl + H] ⁴⁺	1544.44	1544.14
[Insulin + 2 Pt + 2 NH ₃ + Cl + H] ⁴⁺	1548.70	1548.39
[Insulin + 2 Pt + NH ₃ + 2 Cl + 2H] ⁴⁺	1553.22	1553.28
[Insulin + 2 Pt + 2 NH ₃ + 2 Cl + 2H] ⁴⁺	1557.68	1557.64
[Insulin + 2 Pt + 3 NH ₃ + 2 Cl + 2H] ⁴⁺	1561.94	1561.64
[Insulin + 2 Pt + 4 NH ₃ + 2 Cl + 2H] ⁴⁺	1566.46	1566.65

- Triadducts

Assignment	Observed max. m/z	Calculated max. m/z
[Insulin + 3 Pt + 2 Cl – 2H] ⁴⁺	1596.68	1596.60
[Insulin + 3 Pt + 3 NH ₃ + 2 Cl + 2H] ⁴⁺	1610.68	1610.63
[Insulin + 3 Pt + 4 NH ₃ + 2 Cl + 2H] ⁴⁺	1614.66	1614.64

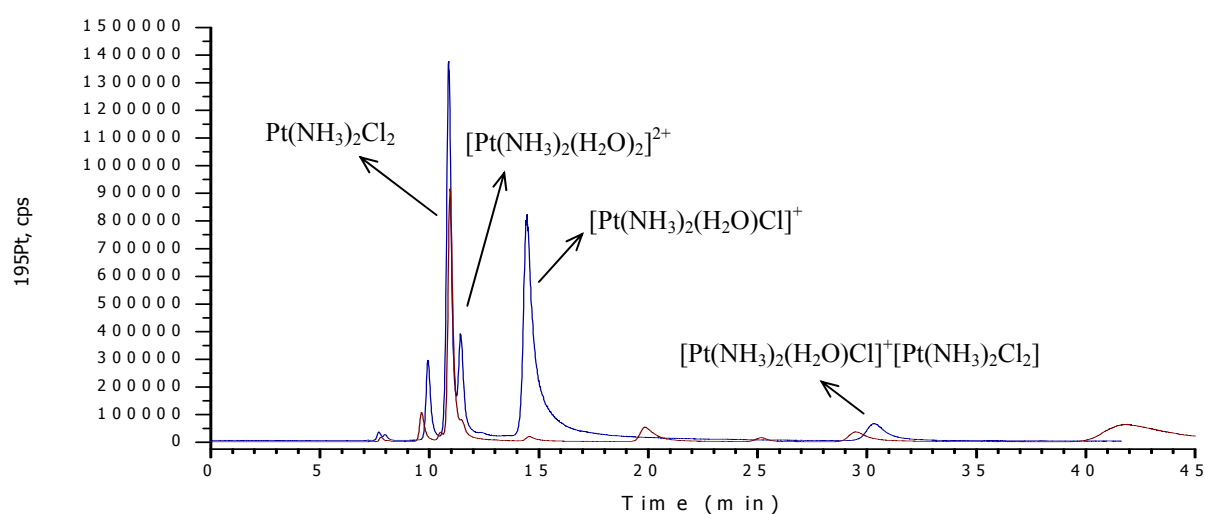
- Insulin A and B chains

Assignment	Observed maximum m/z	Observed monoisotopic m/z	Calculated monoisotopic m/z
[Insulin A-Chain (S-S cleav.) + 2H] ²⁺	1169.00	1167.94	1167.98
[A-Chain + Pt + NH ₃] ²⁺	1273.46	1272.46	1272.47
[A-Chain + Pt + 2NH ₃ + Cl + 1H] ²⁺	1300.28	1298.92	1298.97
[Insulin B-Chain (S-S cleav.) + 4H] ⁴⁺	850.52	849.96	849.92
[B-Chain + Pt + 2H] ⁴⁺	898.78	897.91	897.94
[B-Chain + Pt + NH ₃ + 2H] ⁴⁺	903.02	902.20	902.17
[B-Chain + Pt + Cl + 3H] ⁴⁺	907.78	906.90	906.90
[B-Chain + Pt + NH ₃ + Cl + 3H] ⁴⁺	912.26	911.16	911.18
[B-Chain + Pt + 2 NH ₃ + Cl + 3H] ⁴⁺	916.28	915.40	915.42

Assignment	Observed max. m/z	Calculated max. m/z
[B-Chain + 2 Pt] ⁴⁺	946.90	946.84
[B-Chain + 2 Pt + NH ₃] ⁴⁺	951.16	951.15
[B-Chain + 2Pt + NH ₃ + H ₂ O] ⁴⁺	955.62	955.66
[B-Chain + 2Pt + NH ₃ + Cl + 1H] ⁴⁺	960.16	960.15
[B-Chain + 2Pt + NH ₃ + H ₂ O + Cl + 1H] ⁴⁺	964.66	964.65
[B-Chain + 2Pt + 2NH ₃ + 2H ₂ O] ⁴⁺	968.88	968.67
[B-Chain + 2Pt + 2 NH ₃ + 2 Cl + 2H] ⁴⁺	973.60	973.65

Table S-2 Main peaks observed by MALDI-TOF after 96 h incubation of insulin with cisplatin (1:5) in 0.1% TFA at 37°C.

Assignment	Average mass observed
Insulin	5734.51
Insulin + Pt	5928.76
Insulin + [PtCl]	5964.00
Insulin + [PtNH₃Cl]	5981.05
Insulin + [Pt (NH₃)₂Cl]	5998.16
Insulin + 2Pt	6123.31
Insulin + 2Pt+Cl	6158.27
Insulin + 2Pt + Cl + NH₃	6175.82
Insulin + 2Pt+Cl+2NH₃	6193.64
Insulin + 3Pt	6315.49
Insulin + 3Pt + 2NH₃	6352.59
B-Chain (C-S + S-S cleavage)	3365.95
B-Chain (S-S cleavage)	3399.27
B-Chain (C-S + C-S cleavage)	3430.66
B-Chain (S-S clv.) + Pt	3592.16
B-Chain (S-S clv.) + [PtCl]	3626.88
B-Chain (S-S clv.) + [PtNH₃Cl]	3645.05
B-Chain (S-S clv.) + [Pt(NH₃)₂Cl]	3662.19
B-Chain (S-S clv.) + 2 Pt	3786.44
B-Chain (S-S clv.) + 2 Pt + Cl	3825.47
B-Chain (S-S clv.) + 3 Pt	3980.26

**Figure S-1.** SEC-ICP-MS overlaid chromatograms corresponding to a 96 h evolution of 1.8 mM cisplatin in 0.1% TFA (blue) and in physiological conditions (red).

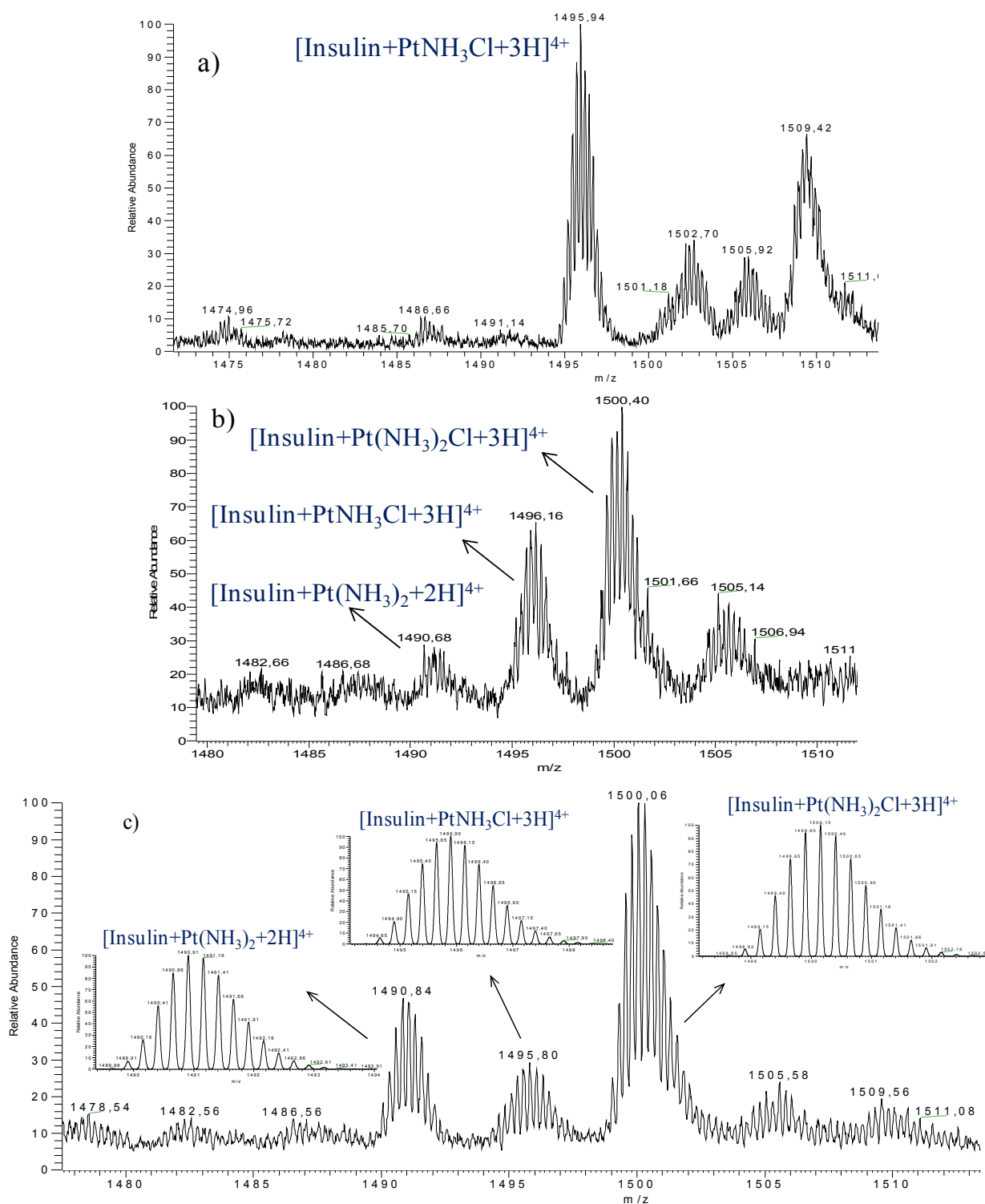


Figure S-2. Spectra of the platinumated insulin monoadducts in the 1480-1510 m/z range. A nESI-LIT in the zoom scan mode was used. a) 30 min 1:1 incubation of insulin and cisplatin in 0.1% TFA, b) 2 hours 1:5 incubation of insulin and cisplatin in physiological conditions, c) 4 hours 1:1 incubation of insulin and cisplatin in physiological conditions. Assignments of the main adducts observed have been made. Insets in c) Theoretical isotopic patterns of the structures proposed.

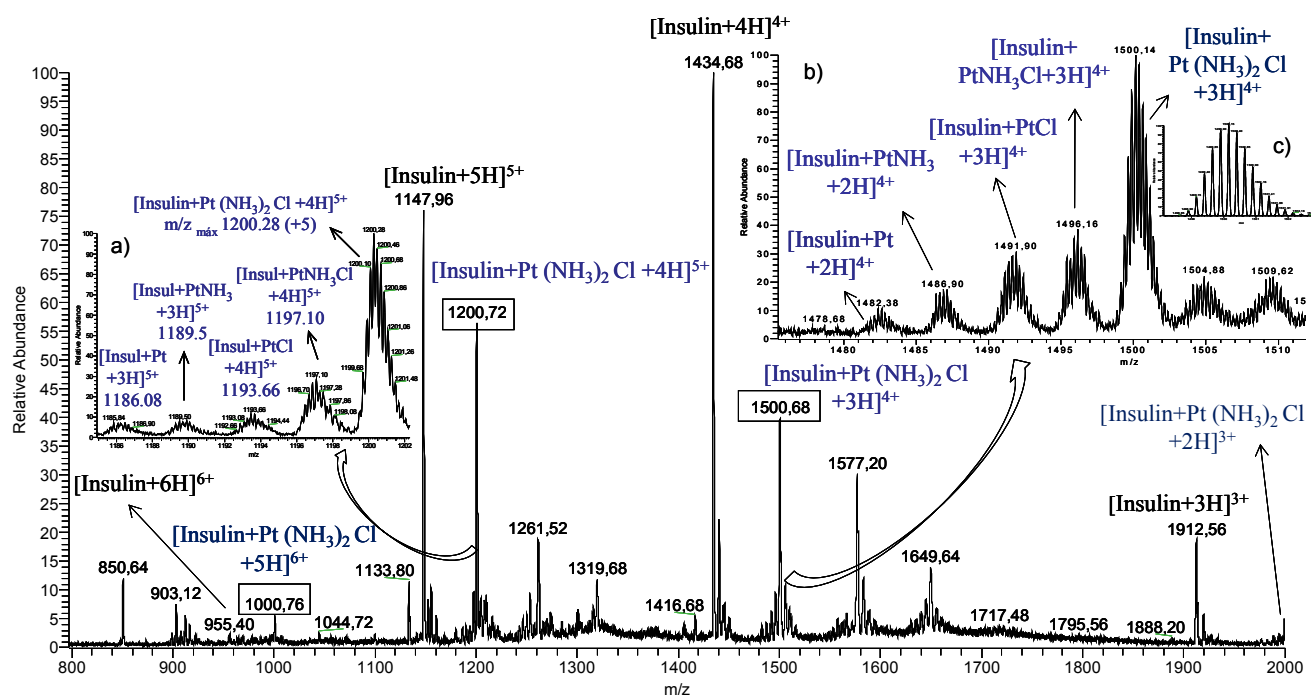
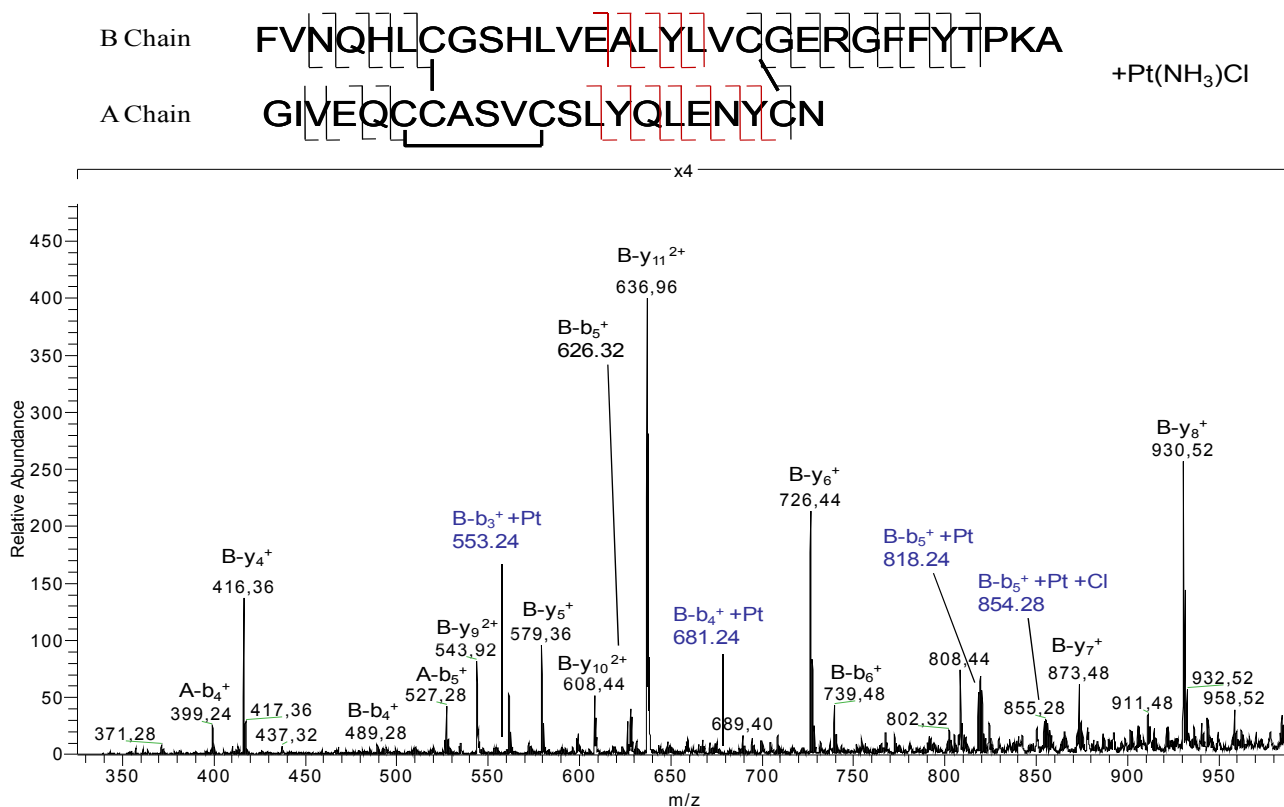


Figure S-3. nESI-LIT-MS spectrum, obtained in the 800 to 2000 m/z range, from a mixture (1:5) of insulin and cisplatin in 0.1% TFA after 96 h incubation. Insulin ions (black) and the predominant monoplatinated adducts (blue), presenting a charge distribution ranging from 3+ to 6+ are shown. Insets: a),b) Zoom scans for the 5+ and 4+ charge region corresponding to the platinated monoadducts; c) theoretical isotopic pattern for the ion [insulin+Pt(NH₃)₂Cl+3H]⁴⁺.

134

a)



b)

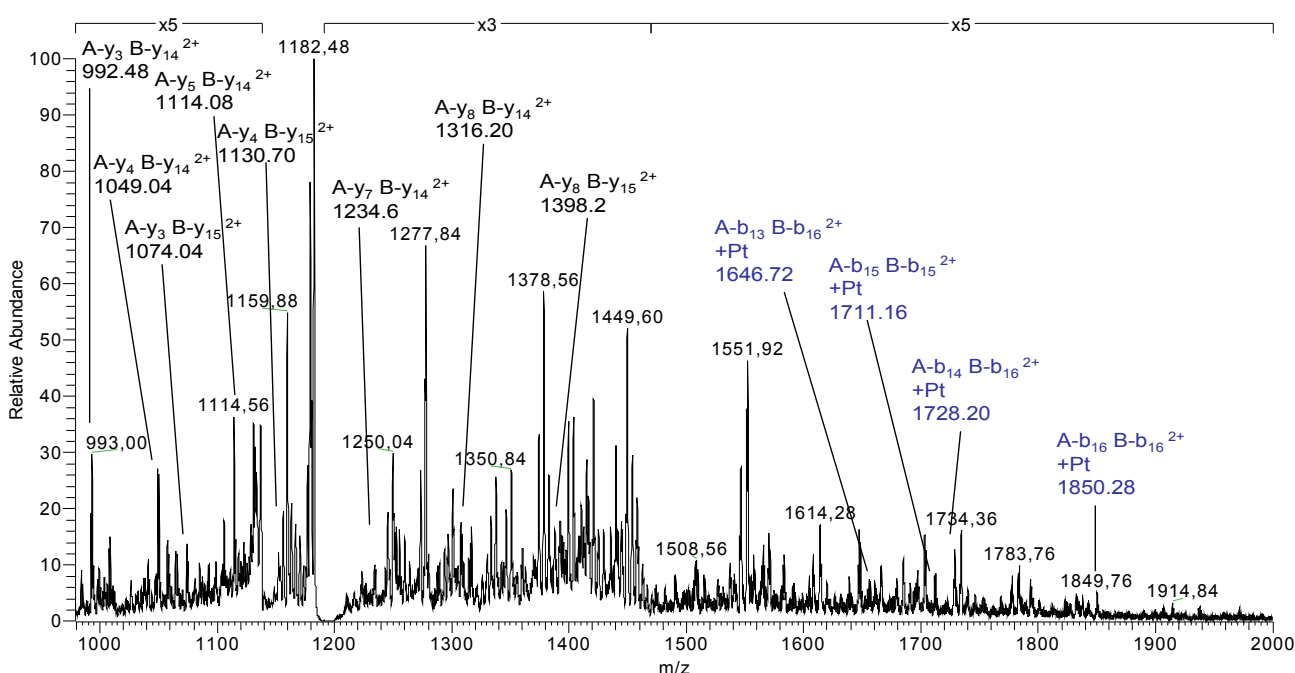


Figure S-5. CID MS/MS spectrum from the (+5) ion observed at m/z 1197. Insulin and cisplatin were incubated for 30 min in 0.1%TFA. a) m/z 400-990 range. b) m/z 990-2000 range. The sequence of the precursor ion and the fragmentation pattern observed are represented above. The most relevant platinum containing fragment ions have been assigned in blue and the insulin fragment ions without platinum in black. Nomenclature has been explained in Figure 3.

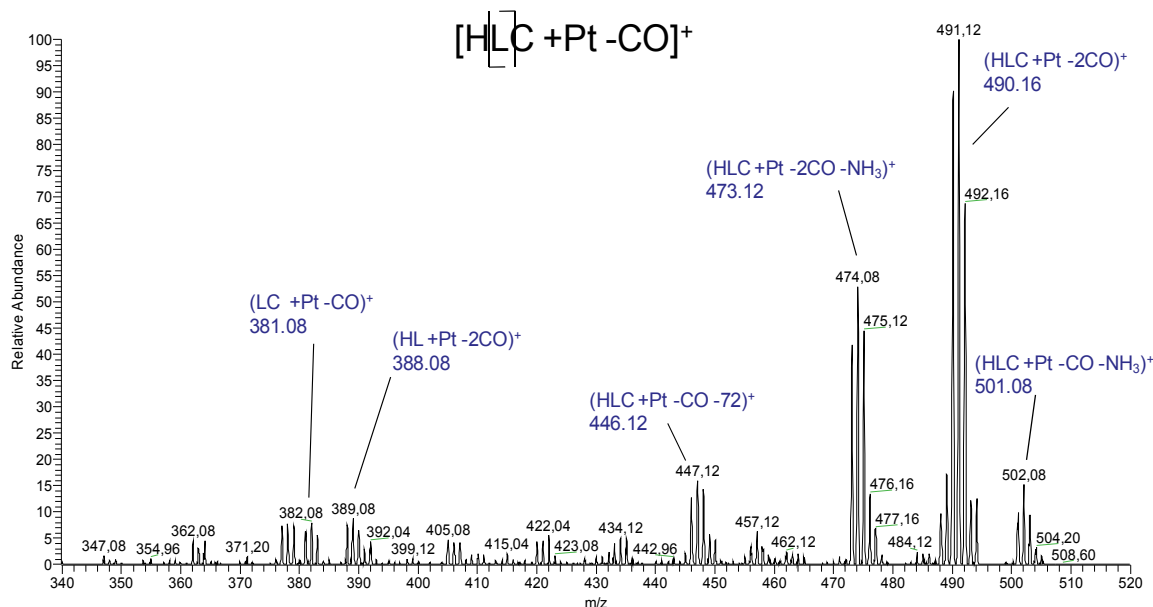


Figure S-6. CID MS⁴ spectrum from the platinum containing ion at m/z 518.16 (1+) obtained after the successive fragmentations of the ions 1498.90 (4+) and 1006.36 (4+), [Transition 1498.9 (4+) -> 1006.36 (4+) -> 518.16 (1+)]. The sequence of this ion and the assignment of its most relevant product ions have been represented.

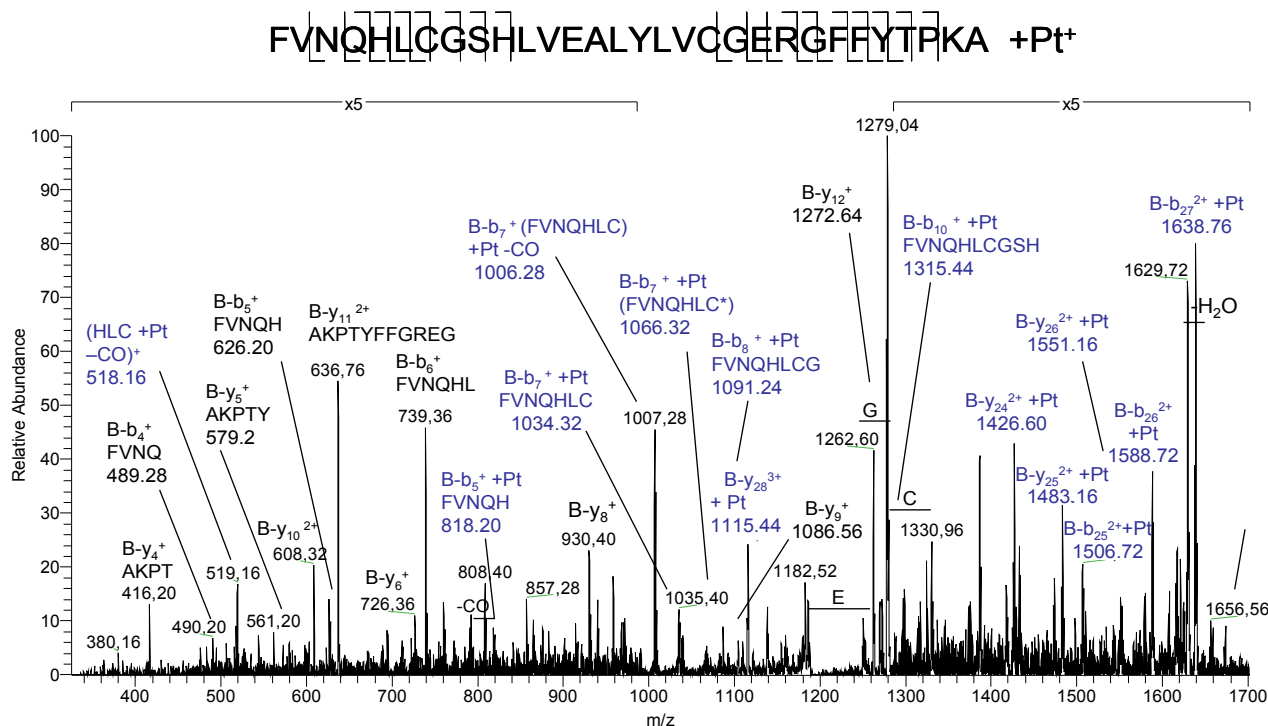


Figure S-7. CID-MS³ spectrum from the platinum containing fragment ion at m/z 1197.88 (1+) observed in the MS² spectrum from the 1498.90 (4+) monoplatinated adduct [Transition 1498.9 (4+) -> 1197.88 (1+)]. C* corresponds to a cysteine conserving both S atoms from the original cysteine. The sequence of the precursor ion, together with the most relevant fragment ions observed, has been represented. Platinum-containing fragment ions have been assigned in blue.

Trabajo 3

“Novel insights into the bottom-up mass spectrometry proteomics approach for the characterization of Pt-binding proteins: The insulin-cisplatin case study.”

Analyst (2010), 135, 1288–1298

Este trabajo fue presentado como Comunicación en formato Póster en la “18th International Mass Spectrometry Conference” celebrada en Bremen (Alemania) en Septiembre de 2009.

Novel insights into the bottom-up mass spectrometry proteomics approach for the characterization of Pt-binding proteins: The insulin-cisplatin case study†

Estefanía Moreno-Gordaliza, Benito Cañas,* María A. Palacios and M. Milagros Gómez-Gómez

Received 23rd December 2009, Accepted 29th March 2010

First published as an Advance Article on the web 21st April 2010

DOI: 10.1039/b927110d

The characterization of the interaction of platinum drugs with proteins has been previously performed using bottom-up proteomics approaches (enzymatic digestion followed by MS analysis). Nevertheless, the study of the stability of the Pt–protein bonds along the whole process has been obviated for the moment. Herein the suitability of the treatments implied during enzymatic digestion of Pt–protein adducts has been evaluated, focusing on the stability of the Pt bonds. Insulin–cisplatin adducts were generated *in vitro* and separated from unreacted cisplatin by HPLC, the separation being checked by HPLC-ICP-MS. The chromatographically isolated Pt–insulin adducts have been proved to resist overnight digestion including treatment with Urea, DTT, IAA and trypsin in a Tris buffer. Direct analysis of the peptides generated by nESI-LIT MS allowed the determination of Pt-binding sites in insulin as: B Chain N-terminus, His5, His10, Cys7, Cys19 and A Chain Cys6, Cys7, Cys20. Results have been compared to a previous top-down approach, indicating that more complete information can be obtained with the bottom-up approach. Reactivity of free cysteines has been proved to prevail to N-donor groups, but when cysteines participate in disulfide bonds, their reactivity is comparable to N-donor sites (N-terminus, His). Preliminary results indicate that the use of High Intensity Focused Ultrasound for accelerating the enzymatic digestions is compatible with preserving Pt–protein bonds, allowing a reduction in the total digestion time to 5 min. Pt-containing peptides were fragmented and sequenced by CID, and results were compared with those obtained by the use of ETD, being CID spectra far more informative.

Introduction

Since the discovery of the antitumor properties of cisplatin ($\text{cis-[Pt(NH}_3\text{)}_2\text{Cl}_2\text{]}$) four decades ago by Rosenberg *et al.*,¹ this compound and other second and third generation platinum drugs, such as carboplatin and oxaliplatin, have been successfully used for the treatment of numerous solid tumors.² The antineoplastic activity of platinum drugs is mainly due to their ability to bind and distort the nuclear DNA, resulting in the induction of either apoptosis or necrosis of tumor cells.³ However, the high reactivity provided by the platinum atom makes these drugs prone to bind to other biomolecules containing nucleophilic groups, such as proteins. Although in some cases this kind of interaction has been proposed as an aid for the transport, cell uptake, and excretion of the drug, it can also limit the amount of free compound available for producing the antitumor activity.⁴ Moreover, when the binding is irreversible, it can be connected with its accumulation in tissues and the induction of side-effects, especially nephrotoxicity and ototoxicity. Furthermore, acquired or inherent resistance to the drug can be due to these interactions, mainly with thiol groups contained in molecules like GSH.⁵ Understanding the interaction between proteins and Pt drugs may be useful for designing improved treatments with reduced

side-effects; therefore, it has been the object of study in the last few years. In this regard, the reactions between model proteins (albumin,⁶ transferrin,⁷ metallothionein,^{8,9} cytochrome C,¹⁰ ubiquitin,^{11,12} myoglobin,¹³ glutathione S-transferase,¹⁴ insulin¹⁵) and platinum based drugs have been studied. Different structural techniques such as nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), X-ray diffraction and mass spectrometry (MS) have been used in order to establish a general trend in the reactivity of Pt-based drugs, with special emphasis on the binding sites in the studied proteins, being something essential to understand the role of the drug binding. In this regard, cysteine and methionine (S-donors) and histidine (N-donor) have been the main reactive residues found towards Pt. The vast majority of such studies have made use of MS techniques, which are also easily coupled to previous liquid chromatography (LC) separation steps, such as the multidimensional protein identification technology MudPIT, which has been used for the study of Pt-binding sites in serum proteins.¹⁶ The use of soft ionization methods, such as electrospray (ESI), on mass spectrometers, makes possible the analysis of intact Pt-containing proteins or peptides and the elucidation of their sequence, keeping the Pt–protein bond intact.¹⁵

Concerning the characterization of Pt-containing proteins using MS techniques, two possible strategies can be performed: the so-called bottom-up and top-down approaches. In general, the study of platinum binding proteins using a top-down MS approach is preferred because it involves analyzing whole proteins, avoiding further treatments and reducing the possibility to lose the Pt attached to the protein during those processes. This

Department of Analytical Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: bcanas@quim.ucm.es; Fax: +34 913944329

† Electronic supplementary information (ESI) available: Additional nESI-MS and MSⁿ spectra. See DOI: 10.1039/b927110d

has been previously proposed, making use of high resolution Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT-ICR-MS) for the study of platinated ubiquitin,¹² electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-Q-TOF MS) in the case of metallothioneins⁹ and nano-electrospray linear ion trap (nESI-LIT MS) for insulin.¹⁵ However, its application generally requires the use of high resolution instruments and is restricted to small proteins, mainly because of the highly complex mass spectra generated. Meanwhile, the classical bottom-up mass spectrometric approach involves the enzymatic digestion of proteins prior to their MS analysis. However, certain reagents involved in that previous treatment, such as ammonium bicarbonate buffer, may remove the platinum moiety from the protein, impairing the determination of the binding sites.¹⁷ Therefore, although this approach has already been applied in some studies, the digestion conditions should be studied in depth in order to ascertain their suitability to study Pt-proteins, preserving the drug:protein binding along the whole process. From a practical point of view, if the digestion conditions allow maintaining the Pt attached to the proteins, and results are attainable using a bottom-up strategy, it is the method of choice, avoiding the interpretation of complex spectra provided by top-down methodologies. Sequence information on peptide/protein ions can be obtained by MS/MS analysis. Traditionally, low energy Collisionally Induced Dissociation (CID) has been the most commonly used method for this purpose.¹⁸ CID activation in gas phase induces a preferential cleavage of the amide bonds in the peptide/protein backbone,¹⁹ giving rise to b/y-type series of fragment ions.²⁰ However, other methods have been lately developed for MS/MS experiments such as Electron Capture Dissociation (ECD)²¹ or most recently, Electron Transfer Dissociation (ETD).²² ECD involves the reaction of low energy electrons with protonated peptides in a FT-ICR-MS, while ETD involves transferring an electron from a radical ion to the peptide ion, being attainable in an ion trap. Both methods produce preferential cleavage of the C α -N bonds along the backbone, generating c/z-type series of fragment ions. These new methodologies, especially ETD, have a great interest in proteomics for the sequencing of highly charged peptides/proteins²³ and the study of post-translational modifications (PTMs), which are preserved during the fragmentation, in contrast to CID.²⁴ In the case of Pt-containing proteins/peptides, CID has also been the fragmentation method most frequently used, the use of ETD not having been evaluated so far. The only reported use of ECD regarding Pt-containing proteins was during the top-down study of platinated ubiquitin, producing no Pt-containing fragments.¹²

Platinum presents a peculiar isotopic distribution that modifies the typical isotopic pattern of a regular peptide, producing a characteristic altered isotopic pattern clearly detectable by MS. This feature can be useful in the bottom-up approach for the recognition of Pt-containing peptides resulting from protein digests, facilitating the identification of the platinated proteins from which they derive and their Pt binding sites. However, this cannot be applied to whole large proteins involved in top-down approaches where the contribution of platinum to the isotopic pattern is less significant.

Insulin is a small protein with two peptide chains (A and B) linked by two inter-chain disulfide bonds, containing another

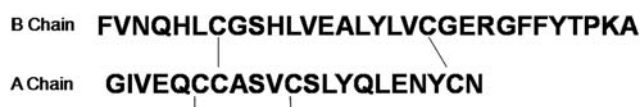


Fig. 1 Bovine insulin amino acid sequence.

intra-chain cystine²⁵ (Fig. 1). It is synthesized in the pancreatic β -cells and participates in the regulation of blood glucose levels. This protein is a suitable model for studying its reaction towards cisplatin due to its low molecular mass (5733.51 Da in bovine insulin) and the presence in its sequence of potentially reactive amino acids towards platinum such as histidines and cysteines participating in disulfide bonds.

This article provides an insight into the stability of the binding in Pt-protein adducts when treated under the conditions and reagents used in a conventional bottom-up approach for protein characterization, something not having been studied in detail as yet. For this purpose, Pt-protein adducts were obtained from incubations of insulin with cisplatin and separated from free cisplatin by high performance liquid chromatography (HPLC). Coupling of HPLC with the highly sensitive and selective elemental MS technique inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), giving rise to HPLC-ICP-MS, permitted the separation and detection of Pt-containing species, and allowed checking the proper isolation of Pt-protein adducts. The chromatographically isolated Pt-insulin adducts were studied as a model, and treated with denaturing (Urea), reducing (dithiothreitol), alkylating (iodoacetamide) and enzymatic (trypsin) agents, and further directly analyzed by nESI-LIT MSⁿ. This bottom-up approach applied on the adducts allowed their characterization and the identification of Pt-binding sites, results having been compared to previous data obtained with a top-down strategy,¹⁵ where their formation was checked by SEC-ICP-MS and their characterization was performed by MALDI-TOF and nESI-LIT MSⁿ. Moreover, the reactivity of cisplatin towards the different amino acid residues in insulin-generated peptides after DTT treatment or complete tryptic digestion has been studied and discussed. On the other hand, several activation methods such as CID or ETD have been evaluated for the fragmentation of Pt-containing peptides, being the first reported use of ETD for this kind of adducts. A great improvement in proteomics was the introduction of High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU), which was demonstrated to produce proteolytic digestion of proteins within seconds, in contrast to the 12–24 h involved in conventional digestions.²⁶ Also, the acceleration of the reduction and alkylation steps can be achieved with HIFU, thus, making possible to perform a whole digestion in just a few minutes.^{27,28} Herein, the use of HIFU for accelerating the enzymatic digestion of Pt-protein adducts has also been evaluated, in terms of the stability of the Pt-protein bonds and compared to conventional treatments.

Experimental

Materials and reagents

Cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin), insulin from bovine pancreas, Urea, iodoacetamide (IAA), dithiothreitol (DTT) and trypsin from bovine pancreas, used for enzymatic digestions,

were purchased from Sigma Aldrich. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) (Fluka) was used for the preparation of the tryptic digestion buffer. High purity hydrochloric acid, used for the pH adjustment of the Tris buffer, was obtained by distillation of the analytical grade reagent (Merck, Darmstadt, Germany). Trifluoroacetic acid (TFA) and formic acid (HCOOH) were obtained from Fluka. HPLC grade acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were supplied by Scharlab. All solutions were prepared with deionized water (Milli-Q Ultrapure water systems, Millipore, USA). Medium nanospray metal-coated borosilicate emitters were obtained from Proxeon (Odense, Denmark). A pH-meter (Crison) or pH indicator strips (pH 6.5–10, special indicator, Merck, Darmstadt, Germany) were used in order to control the pH of the solutions prepared. Centricon YM-3 centrifugal devices (3 kDa cut-off filters) and ZipTips C₁₈ (standard bed of 0.6 µL) were purchased from Millipore (USA).

Instrumentation

HPLC-ICP-Q MS. The *in vitro* insulin–cisplatin incubations were subjected to speciation studies by the coupling of an HPLC (see “*In vitro* generation and isolation of cisplatin–insulin adducts”) with a Quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-Q MS) Thermo X-Series (Thermo Scientific, Windsford, Cheshire, UK), for the specific detection of Pt. The system was configured for the introduction of organic solvents, equipped with a Micromist Meinhard nebulizer, a Fassel torch and an Impact Bead Quartz spray chamber cooled by a Peltier system at -8°C , and platinum sampler and skimmer. Single ion monitoring of m/z 194 (Pt) and 195 (Pt), was used to collect data. The instrumental parameters used for ICP-MS analyses were set as follows: Forward Power: 1400 W, Plasma Gas: 15 L min⁻¹ Ar, Auxiliary Gas: 7.3 L min⁻¹ Ar, Nebuliser Gas: 0.75 L min⁻¹ Ar, Additional Gas: 22 a.u. O₂; Channels per AMU: 10; Integration time: 100 ms.

nESI-LIT MS. A linear ion trap LTQ XL with ETD (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nano-electrospray source from Proxeon (Odense, Denmark), was used for the nESI-MS/MS experiments performed on all the samples. The instrumental parameters were tuned with a solution of 2 µM human [Glu¹]-Fibrinopeptide B, prepared in 70% ACN, 0.1% HCOOH. During the analysis, the parameters were typically set to: Capillary Temperature: 200 °C, Capillary Voltage: 30 V, Tube Lens: 105 V, Spray Voltage: 0.70 V. When incubated in acidic conditions, the peptide solutions were directly infused after a 1 : 10 dilution with 70% ACN, 0.1% HCOOH. A desalting step, required when dealing with salty samples or for unreacted cisplatin removal, was performed by micro-solid phase extraction using ZipTips C₁₈ (Millipore), eluting the samples in 70%ACN, 0.1% HCOOH prior to the analysis. CID and ETD were used for the fragmentation of ions in MSⁿ experiments. The isolation width of the precursor ions was selected as required, depending on the case, so that the whole isotopic pattern of the ion was included for the fragmentation. Typically, the conditions applied during the CID experiments were: 35% collisional energy and activation time of 30 ms. ETD experiments were performed using fluoranthrene as reagent for the production of radical anions. The reaction time was

optimized depending on the precursor ion, and typically set to 100 ms. Spectra were acquired in the positive ion mode, over the m/z range 50–2000.

Methods

***In vitro* generation and isolation of cisplatin–insulin adducts.** Insulin was incubated with cisplatin in an aqueous solution containing 0.1% TFA at a 1 : 5 molar ratio for 96 h at 37.0 °C in a thermostatic bath (Neslab RTE-111), as described in a previous work, where the formation of insulin–cisplatin adducts was checked by SEC-ICP-MS, MALDI-TOF and nESI-LIT MS.¹⁵ In order to avoid subsequent reactions of unreacted cisplatin during later treatments, it was removed from the resulting incubations using a reverse phase C₁₈ cartridge (Discovery Bio-Wide Pore C₁₈, 2 cm × 2.1 mm, 5 µm, pre-column, Supelco), eluted with a gradient consisting in: 100% A 0–4 min, 100% A to 100% B 4–5 min, 100% B from 5 min (A: 5% MeOH, 0.1% TFA, B: 70% MeOH, 0.1% TFA), at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹. A high-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089), equipped with an injection valve (Rheodyne, USA) was used as a sample delivery system. Samples were filtered through a 0.22 µm Nylon filter and injected onto the chromatographic system using a 100 µL sample loop. Typically, 200 µg of insulin were injected on each run. The chromatographic system was coupled to an ICP-MS to check the proper separation of cisplatin from the isolated protein fraction (see ICP-MS section) and to discern the retention time of the platinated protein adducts. Samples with either unreacted cisplatin or insulin–cisplatin incubations were used as controls. A cisplatin control sample injected onto the system gave rise to a single Pt-peak eluted in the void volume. When the *in vitro* incubation was analyzed, in addition to the former peak, a new Pt-containing peak eluted at retention time: 8.2–9.2 min, corresponding to the insulin–cisplatin adducts, as can be seen in Fig S-1, ESI.† The isolated Pt–protein adducts chromatographic fraction was collected and two individual fractions were pooled. Further preconcentration using a Centricon YM-3 cut-off filter, by centrifugation at 6500 g, facilitated the change of solvent to a buffer with pH 7.8, needed to get the highest enzymatic activity of trypsin during the subsequent in-solution digestion process.

Further treatments on Pt–insulin adducts. The isolated insulin–cisplatin adducts were subjected to a complete tryptic digestion including denaturing, reducing and alkylating steps. A typical complete in-solution tryptic digestion includes: denaturing of the protein sample with 8 M Urea in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8), followed by addition of DTT (final concentration 10 mM), and incubation for 1 h at 37 °C, in order to reduce the disulfide bonds in the proteins. Then, iodoacetamide is added to a final concentration of 50 mM, followed by incubation for 45 min at 30 °C in the darkness, to block the free thiols generated. Finally, the solution is diluted with Tris buffer, leaving the Urea concentration at 2 M, and trypsin is added at a 1 : 15 (w : w) ratio, followed by incubation at 37 °C overnight (for approx. 16 h). All the digestions were performed using a Thermomixer compact (Eppendorf) at 700 rpm. The final volume was between 600–1000 µL. Insulin was also digested using the described procedure as a control.

Additionally, separate and sequential treatments of the insulin–cisplatin adducts with the reagents used in a typical tryptic digestion were performed in order to evaluate the stability of the cisplatin–insulin bonds along the digestion process. Separate samples were treated with: 1) Urea and DTT; 2) Urea, DTT and trypsin; or 3) Urea, DTT and IAA. All these treatments were performed in the same conditions and concentrations as in the whole digestion process described above.

A Vibra cell VCx130 High Intensity Ultrasonic Processor (Connecticut, USA) equipped with a 2 mm titanium microtip probe and fitted with a high-frequency generator of 130 W, 20 KHz, was evaluated for its use in order to accelerate the whole tryptic digestion process. In a first experiment, trypsin was added to the isolated platinated protein in a 1 : 15 (w : w) ratio, in a 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) buffer, and sonicated for 1 min. Additionally, HIFU was used to accelerate the steps in a complete in-solution tryptic digestion of the isolated adducts: reduction (8 M Urea + 10 mM DTT + 2 min sonication), alkylation (IAA + 2 min sonication) and enzymatic digestion (1 : 15 w : w protein : trypsin + 1 min sonication). For all the HIFU experiments, samples were treated at 4 °C (ice bath) using the ultrasonic probe at 50% amplitude, with final digestion volumes of 600 μ L. Parallel digestions applying the conventional overnight treatments at 37 °C were performed for comparison.

Incubation of insulin peptides with cisplatin. Insulin peptides were produced applying the whole described complete tryptic digestion procedure (see previous section) on 1 mg of insulin. Alternatively, insulin A and B chains were generated after the treatment of the same amount of protein with 8 M Urea and 10 mM DTT (50 mM Tris-HCl, pH 7.8). All the peptides generated were desalted and separated from the digestion reagents using a C₁₈ cartridge, with 5% ACN, 0.1% TFA and eluted with 70% ACN, 0.1% TFA. The peptide fractions collected were evaporated in a vacuum concentrator (Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, Germany). Samples were resuspended in 0.1% TFA and peptides were incubated with cisplatin in a molar ratio of 1 : 5 for up to 96 h at 37 °C.

Results and discussion

Study of the effect of the reagents used for tryptic digestions on the binding between insulin and cisplatin

The isolated *in vitro* generated insulin–cisplatin adducts were subjected to several treatments with the reagents used in the regular procedure for tryptic digestion (Urea, Tris, DTT, IAA, trypsin) in order to evaluate the effect of these compounds on the Pt–protein binding. The sample treated with 8 M Urea and 10 mM DTT, in 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), was incubated for 1 h at 37 °C and analyzed by nESI-LIT MS. The mass spectrum observed presented, aside from the main peaks corresponding to unreacted A and B chains, Pt-containing peptides that have been assigned to both the platinated A and B chains (Fig. 2a). The platinum-containing peptides can be recognized by their characteristic isotopic pattern as is shown in Fig. 3. It can be seen in Fig. 2a that the main adducts observed correspond to [A chain–Pt(NH₃)₂]²⁺ and [B chain–Pt(NH₃)₂]³⁺ at *m/z* 1282.76 and 1208.82, respectively. Compared to the adducts observed in the

original incubation ([insulin–Pt(NH₃)₂Cl]),¹⁵ there seems to be a Cl missing in the platinated peptides found. This difference may be ascribed to the change in the pH of the media of the original and digested samples. A change from acidic to a more basic pH enhances the conversion of the monodentate adduct into a bidentate ligand, due to the additional coordination to the N in the amide bond adjacent to the side chain of the aminoacidic binding site (involving a H⁺ loss). This is something that will be common to all the digested samples, but that has no real influence on the search of the main binding sites in the protein,¹⁵ and even less for the case of a protein from a biological sample, originally at pH 7.4. Other observed peaks seem to correspond to ammine losses from the adducts, which happens to be a common episode at the ionization source. Therefore, it is demonstrated that the Pt–protein bond resists the action of the denaturing and the reducing agents (Urea and DTT) in the Tris buffer used.

Samples subjected to further overnight treatment with the enzyme trypsin, at 1 : 15 (w : w) at 37 °C (following the treatment with Urea and DTT) were also analyzed by nESI-LIT MS. The MS spectrum showed platinum-containing peptides involving both A and B chains (Fig. 2b), being [FVNQHLCGSHLVEA-LYLVCGER + Pt(NH₃)₂]²⁺ and [A-chain + Pt(NH₃)₂]²⁺ at *m/z* 1356.98 and 1283.02, respectively, the main ions. Therefore, overnight digestion with trypsin in a Tris buffer does not induce the loss of the Pt moiety, in contrast to what has been observed in overnight treatments using a bicarbonate buffer, which may produce that effect.¹⁷

Moreover, the use of IAA as an alkylating agent was evaluated by treating with 50 mM IAA for 45 min at 30 °C the resulting samples after the described treatment with Urea and DTT. The nESI-LIT MS analysis of this sample (Fig. 2c) allowed the detection of platinated peptides, being the most intense the ions [FVNQHLC*GSHLVEALYLVC*GERGFFYPKA + Pt + NH₃]³⁺ and [GIVEQC*C*ASVC*SLYQLENYC*N + Pt + NH₃]²⁺, at *m/z* 1241.14 and 1388.46, respectively (C* denotes a carbamidomethylated cysteine). Therefore, it seems that platinum remains attached to both A and B chains even after the carbamidomethylation of the cysteines. However, there is a slight trend to lose one of the ammine ligands previously attached to platinum as a consequence to the alkylation. A possible explanation is that after the carbamidomethylation (the addition of a –CH₂CONH₂ group to the sulfur in the cysteines), the Pt attached to the S in the cysteine and to the N belonging to the adjacent amide bond, encounters a new additional coordinative N-donor site in the new group, behaving as a tridentate ligand towards the peptide and losing one of its original NH₃. This tendency is complete for A chain and partial in the case of B chain, where aside from cysteines, N-donors are possible binding sites. Furthermore, apart from these ions, others present two ammine groups, with one of them being lost in the ion source. All these facts do not mean a real change in the overall binding sites, so IAA can be used before trypsin digestion, to block cysteines that were previously platinated.

Considering all the previous results, the binding between insulin and cisplatin adducts was demonstrated to survive the treatment with the different reagents used during routine procedures for *in solution* tryptic digestion. Platinum atoms bound to the protein seem not to be removed from it. Thus, the complete overnight tryptic digestion approach described can be

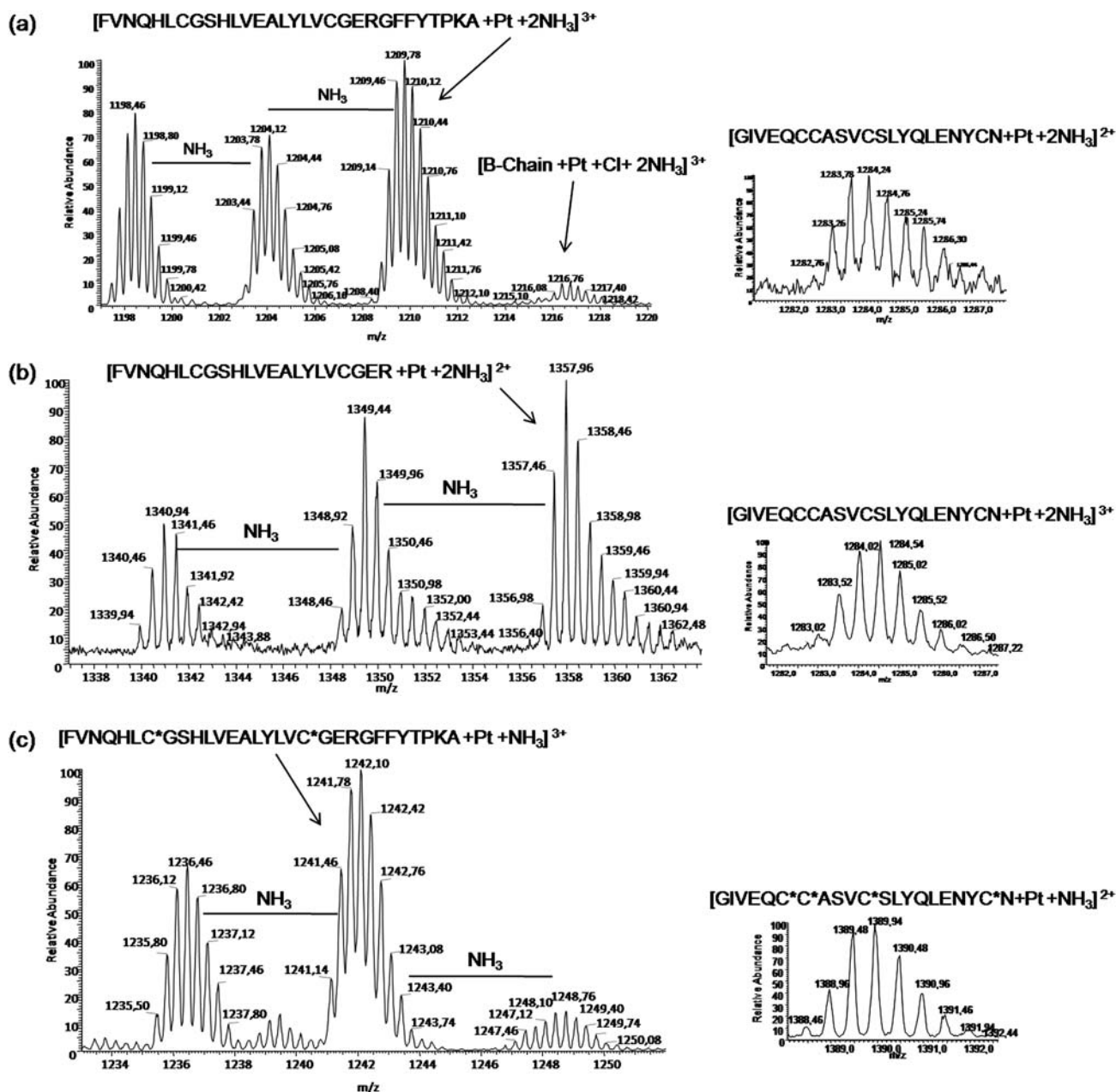


Fig. 2 Platinum-containing ions observed in the nESI-LIT mass spectra of isolated insulin-cisplatin adducts treated with: (a) 10 mM DTT, 8 M Urea; (b) 8 M Urea, 10 mM DTT, trypsin 1 : 15 w : w; (c) 8 M Urea, 10 mM DTT, 50 mM IAA. The zoom scans show platinum adducts involving both insulin A and B chains, demonstrating their survival along the treatments.

performed in order to generate peptides which may allow determining the platinum binding sites in a protein, by further analysis by nESI-LIT-MSⁿ.

Determination of Pt-binding sites in tryptic digests from insulin-cisplatin adducts

The isolated insulin-cisplatin adducts were treated overnight at 37 °C with Urea, DTT, IAA and trypsin in a 50 mM Tris-HCl pH 7.8 buffer, and analyzed by nESI-LIT MS. Samples of insulin digested using the same treatment were also analyzed as a control. Although the main peptides detected in the platinated sample had a regular isotopic pattern, some were identified as

platinum-containing peptides, due to their characteristic isotopic pattern, as can be seen in Fig. 3b and 3c. The main adducts identified were: [FVNQHLC*GSHLVEALY + Pt(NH₃)₃]²⁺, at *m/z* 1048.50; [FVNQHLC*GSHLVEALYLVC*GER + Pt(NH₃)₃]³⁺, at *m/z* 937.30; [GIVEQC*C*ASVC*SLYQLENYC*N + Pt(NH₃)₃]²⁺, at *m/z* 1388.18; and [GIVEQC*C*ASVC*SLY + Pt(NH₃)₃]²⁺, at *m/z* 927.58 (Fig. 3a and Fig. S-2, ESI[†]), the ones involving B chain having a higher intensity than those from A chain. As can be observed, on prolonged overnight treatment, the trypsin used exhibited some degree of chymotryptic activity, producing further cleavage after Tyr (Y) residues in addition to the expected after Arg (R) and Lys (K) residues. These platinated peptides were subjected to CID-MSⁿ experiments in order to be

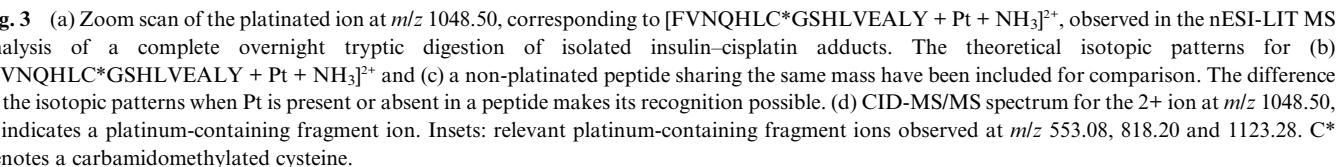


Fig. 3d shows the CID-MS² spectrum of the peak at m/z 1048.50 ([FVNQHLC*GSHLVEALY + Pt(NH₃)]²⁺) in which both platinated and unplatinated b- and y- ion series could be

m/z 441.08, which was assigned to the ion $[\text{QH} + \text{Pt-NH}_3]^+$, His5 was revealed as an additional binding site for Pt. Additionally, the platinum-containing fragment at 1453.52 (1+), corresponding to $[\text{LC*GSHLVEALY} + \text{Pt}]^+$, found in the CID-MS² spectrum of 1048.50 (2+), was also fragmented by CID (Fig. S-4, ESI†). Subfragments at 466.04(1+) and 610.12 (1+) in the MS³ spectrum, attributed to $[\text{LC*Pt}]^+$, $[\text{LC*GS} + \text{Pt}]^+$, pointed out Cys7 as another possible binding site for cisplatin on insulin. These results are in accordance with those previously reported in a top-down approach performed on the whole insulin–cisplatin adducts, revealing by CID-MSⁿ experiments these same Pt-binding sites on insulin: B-Chain N-terminus, His5, Cys7 and His10.

The ion observed at 937.30 (3+), $[\text{FVNQHLC*GSHLVEALYLVC*GER} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{3+}$, was fragmented in order to get further information on platinum binding sites (as can be seen in Fig. S-5, ESI†). The CID-MS² spectrum showed a fragment at m/z 1401.36 (1+), corresponding to $[\text{EALYLVC*GER} + \text{Pt}]^+$, which was isolated and fragmented by CID. This subsequent fragmentation produced a subfragment at m/z 1041.2 (1+), $[\text{EALYLVC*Pt}]^+$ which was the first platinum-containing fragment on the b-series, indicating that platinum can also be bound to B-chain Cys19 (data not shown).

On the other hand, A chain platinated ions were fragmented by CID. The MS² spectrum of $[\text{GIVEQC*C*ASVC*SLYQLENYC*N} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, at 1388.18(2+), showed series of b and y ions, both with and without platinum, as can be seen in Fig. S-6, ESI†. The first platinated y-ion was found at m/z 648.16 (1+), corresponding to $[\text{YC*N} + \text{Pt}]^+$, indicating that Pt is most probably bound to A Chain Cys20. A low intensity platinated ion at 879.2 (1+) could be recognized, corresponding to the first b ion with Pt, $[\text{GIVEQC*Pt}]^+$, pointing out that Pt can be attached to A Chain Cys6 as well. A high intensity ion at 1039.24 (1+), attributed to $[\text{GIVEQC*C*Pt}]^+$, was also observed. The CID-MS³ of the latter fragment (Fig. S-7, ESI†) gave rise to subfragments at m/z 513.08 (1+) and 353.08 (1+), corresponding to $[\text{C*C*Pt}]^+$ and $[\text{C*Pt}]^+$, respectively. Therefore, it can also be proposed that Pt is attached to A Chain Cys7. Furthermore, the ion at 927.58 (2+), $[\text{GIVEQC*C*ASVC*SLY} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^+$, was also fragmented by CID, producing an MS² spectrum (Fig. S-8, ESI†), in which no evidence on the binding to Cys11 was found. All in all, as can be seen, new binding sites were found both in A and B chains compared to the ones found in the mentioned top-down approach. Those new sites are cysteines: 6, 7 and 20 in A Chain and 19 in B Chain. It is therefore demonstrated that the bottom-up approach allows finding Pt binding sites more easily than in a top-down approach. Smaller peptides produce more complete fragmentation spectra, easier to interpret than undigested large peptides or small proteins. Therefore, all the binding sites are straightforwardly recognized when dealing with tryptic peptides. In this case, on the previous top-down approach, the presence of disulfide bonds in the complete protein made difficult its sequencing and the recognition of some of the Cys as Pt binding sites, due to the impaired fragmentation of disulfide bonds by CID. This difficulty, added to dealing with a structure with multiple simultaneous binding sites obscured some minor binding sites in the top-down approach. Regarding the reactivity of platinum towards native insulin, it was confirmed that cysteines show a certain degree of reactivity

towards cisplatin in spite of being involved in disulfide bonds as has been previously suggested.¹⁵ However, they do not seem to be more reactive than the additional N-donor binding sites found (B Chain N-terminal and His). These same results were confirmed when this bottom-up approach was performed on insulin–cisplatin equimolar incubations on the same conditions, providing the same binding sites (data not shown). The binding of cisplatin to sulfur atoms from cysteines is in accordance with the partial separation of A and B chains observed in the original incubations of insulin and cisplatin in acidic conditions.¹⁵ This dissociation, only observed in acidic conditions, is due to the cleavage of the interchain disulfide bonds linking A and B chains after the binding of Pt to the sulfur atoms.

HIFU-assisted tryptic digestions of insulin–cisplatin adducts

A comparative study was performed between HIFU-assisted tryptic digestions of isolated insulin–cisplatin adducts and the conventional overnight incubation at 37 °C. Analyses by nESI-LIT MS of the samples after tryptic digestions using both treatments provided similar results both showing a tryptic cleavage after Arg22, being the fragment GFFYTPKA lost from the protein, and the rest of the sequence keeping up to 2 Pt atoms after the treatment. However, slight differences were observed with respect to the ligands attached to the platinum atom (Fig. 4). In the case of the HIFU-assisted digestion, the distribution of mono-adducts observed is similar to the one obtained in the analysis of the original *in vitro* incubation, being $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}$ the main moiety attached to the protein and acting as a monodentate ligand. On the contrary, when incubated overnight, an evolution in the platinated adducts takes place, producing as the main moiety attached to the protein the bidentate $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$, being the Cl ligands lost. This fact is due to the previously mentioned change in the pH of the medium from acidic, in the original samples, to basic, induced by the Tris buffer. This process occurs with time, therefore in the overnight digestion at 37 °C, but seems to be prevented when HIFU reduces the digestion time to just 1 min. When HIFU was applied to a whole digestion process including reduction, alkylation and tryptic digestion, similar results to those provided by the classical overnight digestion procedure were obtained in 5 min. In this case, nESI-LIT MS analysis of the sample showed as main Pt-containing peaks $[\text{FVNQHLC*GSHLVEALYLVC*GER} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{3+}$ at m/z 937.3 (3+), and $[\text{GIVEQC*C*ASVC*SLYQLENYC*N} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, at m/z 1388.2(2+). The CID fragmentation patterns of these ions were the same as those obtained for the same platinated ions from the samples treated with the classical overnight procedure (data not shown). Therefore, it can be concluded that the use of HIFU is compatible with the preservation of insulin–platinum bonds, being a suitable method for reducing the total treatment time to a few minutes. Moreover, it seems that trypsin retains its primary activity and there is no significant chymotryptic cleavage when the digestion is accelerated using HIFU, which might be useful if it was not desired.

Incubation of insulin tryptic peptides with cisplatin

Insulin tryptic peptides (containing carbamidomethylated cysteines) were incubated with an excess of cisplatin and

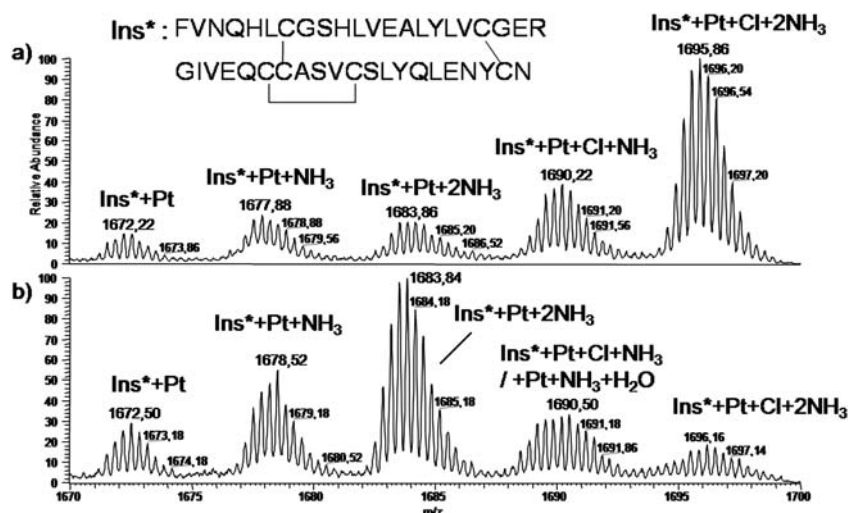


Fig. 4 nESI-LIT MS of tryptic digests from partially purified insulin-cisplatin adducts. Zoom scans in the 1670–1700 m/z range showing mono-platinated ions are presented for a) 16 h treatment at 37 °C and b) HIFU-assisted treatment at 50% amplitude, 4 °C, 1 min. Ins* denotes insulin with a tryptic cleavage after Arg22.

analyzed by nESI-LIT MS in order to evaluate the reactivity of the different potential binding sites in the protein. As can be seen in Fig. S-9, ESI,† numerous and quite intense platinum-containing peptides involving both A and B chains could be recognized in the mass spectrum of the sample: GIVEQC*C*ASVC*SLY + Pt, GIVEQC*C*ASVC*SLYQLENY + 2Pt, QLENYC*N + Pt, C*ASVC*SLY + Pt, FVNQHLC*GSHLVEALY + Pt, FVNQHLC*GSHLVEALY + 2Pt, FVNQHLC*GSHLVEALYLVC*GER + Pt, (where NH_3 ligands have been omitted for clarity) at m/z 918.92(2+), 1023.56(2+), 1132.04(1+), 1151.00(1+), 1057.56(2+), 1189.08(2+), 1396.76(2+), respectively, among others. These ions were fragmented by CID, following the same strategies as those applied in the previous section. Similar fragmentation patterns as those observed in the MS^n experiments described for the peptides generated from the *in vitro* Pt-insulin adducts were obtained (data not shown), revealing the following Pt binding sites:

N-terminus, His5, Cys7, His10, Cys19 in B-Chain, and Cys6, Cys7, Cys11 and Cys20 in A-Chain. Therefore, except for Cys11, the binding sites were the same as those found in the native protein incubated with cisplatin, but the extent of the reaction seems to be slightly higher than in the case of the whole protein, probably due to the improved accessibility to the peptides by cisplatin. Moreover, in light of results, carbamidomethylated cysteines are still able to react with cisplatin despite being alkylated but they are not significantly more reactive than N-donors such as His or the N-terminal. Therefore, all the binding sites can be found with no clear particular preference.

Additionally, insulin treated with Urea and DTT, producing the separation of A and B chains, and afterwards incubated with a 10 fold excess of cisplatin for 24 h, was analyzed by nESI-LIT-MS. Fig. 5 shows the mass spectrum in the range between m/z 1257 and 1460, where insulin B Chain adducts with 2, 3 and up to 4 Pt moieties were observed. Interestingly, no adducts with only

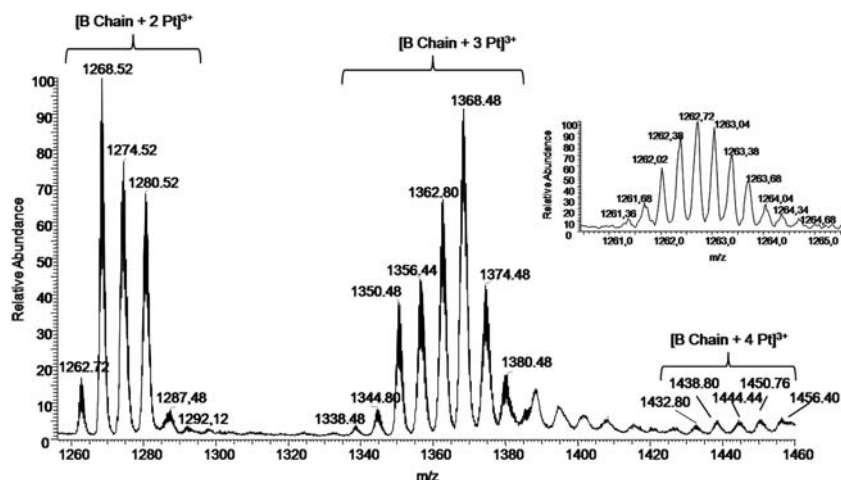


Fig. 5 nESI-LIT MS in the m/z range 1257–1460, showing platinated Insulin B chain ions produced in the samples after the incubation with cisplatin of insulin previously treated with 8 M Urea and 10 mM DTT. Ligands attached to Pt have been omitted for clarity. Inset: Zoom scan showing the isotopic pattern of the ion corresponding to [B-Chain + 2Pt] $^{3+}$ at m/z 1261.36.

one Pt moiety could be detected. This fact could be explained by the presence of two free cysteines in B Chain, which may act as highly reactive binding sites towards platinum. Fig. S-10, ESI[†] shows the spectrum produced by CID-MS² performed on the diplatinated adduct at m/z 1261.36 (3+). The fragmentation pattern was very peculiar, as there were no backbone cleavages inside the region limited by the two cysteines present in this peptide. Furthermore, the non platinated b- and y-ions present had no Cys residues, being in the low m/z range. Sequences of

fragment-peaks containing Pt were detected for both, b- and y- series, only above 1284.32 (2+) and 1524.48 (2+) respectively, m/z values which correspond to the following ions: $b_{20}^{2+} + 2\text{Pt}$, $[\text{FVNQHLGSHLVEALYLCG} + 2\text{Pt}]^{2+}$, and $y_{24}^{2+} + 2\text{Pt}$, $[\text{CGSHLVEALYLCGERGFFYTPKA} + 2\text{Pt}]^{2+}$. Following these ions, subsequent platinated ions from b- and y-series were observed, as well as an internal fragment corresponding to $[\text{CGSHLVEALYLCGE} + 2\text{Pt}]^+$ at m/z 1958.56. Therefore, it can be deduced that Pt is most probably bound to free cysteines

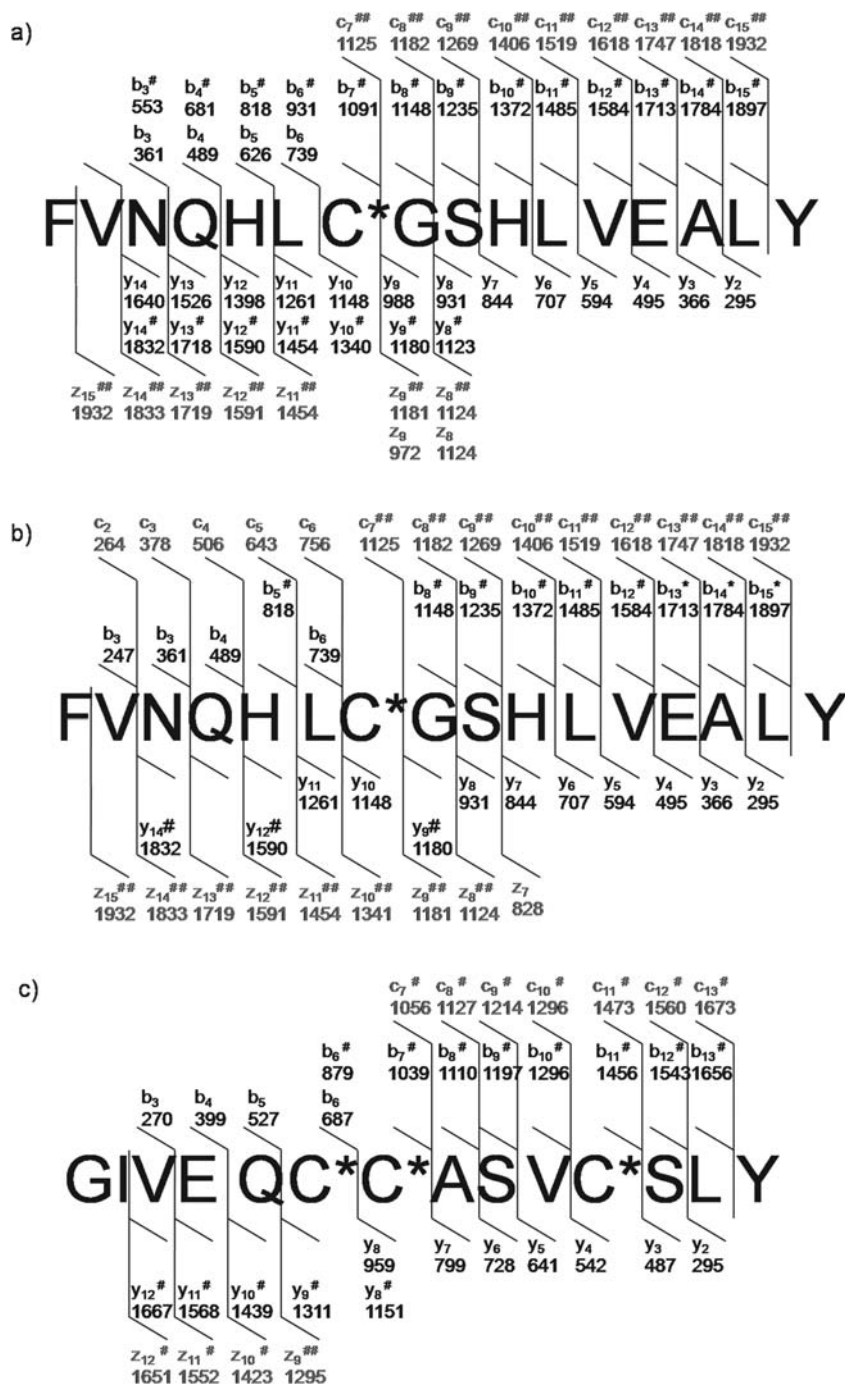


Fig. 6 Comparative CID- (black) and ETD- (grey) MS/MS fragmentation patterns of the ions at (a) m/z 1048.5 (2+), (b) m/z 699.3 (3+), both corresponding to the peptide $[\text{FVNQHL C*GSHLVEALY} + \text{Pt} + \text{NH}_3]$ obtained in a tryptic digest, and (c) m/z 918.92 (2+), corresponding to the peptide $[\text{GIVEQC*C*ASVC*SLY} + \text{Pt} + \text{NH}_3]$. # represents a Pt moiety. ## denotes a Pt + NH₃ moiety. C* denotes a carbamidomethylated cysteine.

(Cys7 and Cys19) above N-donor sites, not having been found b-ions pointing to a platination of the N-terminus or the His5 residue. Only when B chain ions containing three Pt moieties were fragmented (e.g. 1348.57 (3+)), could platinated b-ions be observed involving these N-donor residues: 553(1+) and 818(1+), [FVN + Pt]⁺ and [FVNQHL + Pt]⁺, respectively, being these binding sites secondary with respect to free cysteines. Therefore, free thiols in cysteines react preferentially with cisplatin and in a shorter time than the rest of the groups in the protein, in contrast to what has been obtained when cysteines are modified, either involved in disulfide bonds or as thioethers when carbamidomethylated, being less reactive and acting similarly to N-donors.

CID vs. ETD fragmentation of Pt-containing peptides

The use of ETD for the activation and fragmentation of platinum-containing peptides was evaluated and compared to fragmentation using the conventional method based on CID. The most abundant platinum containing peptide present in the tryptic digest, [FVNQHLC*GSHLVEALY + Pt + NH₃] (at *m/z* 1048.5 (2+) or 699.3 (3+)), was fragmented by both, ETD and CID. Fig. 6a shows the comparative CID and ETD fragmentation patterns for the 2+ ion. As can be seen, almost complete b- and y-series of ions were observed when fragmented by CID. The presence or absence of Pt in these ions allowed the assignment of the amino acid residues responsible of the Pt binding (in this case B-chain N-terminal and His10, in addition to the Cys7 and His5 that could be recognized by further MSⁿ). However, when the same peptide was fragmented using ETD, only incomplete series of c- and z-ions were obtained, being absent those with *m/z* lower than 1124. A similar trend is observed when the same 2+ peptide without Pt was fragmented (data not shown). Probably, in this case, the low charge state of the precursor-ion is responsible of the low yield of the ETD fragmentation. But, aside from this issue, Pt-containing fragments were observed during fragmentation with ETD with a high S/N ratio, in contrast to a previously reported top-down approach of platinated ubiquitin making use of ECD.¹² Interestingly, these platinated fragment ions kept the NH₃ ligands attached to Pt, in contrast to those produced by CID, which usually induces their loss. On the contrary, when the 3+ platinated ion was fragmented, the results were quite different, as can be seen in Fig. 6b. While the fragmentation using CID yielded a worse coverage than for the 2+ ion, still a significant amount of sequence was obtained and Pt binding sites could be pointed out to be located in the N-terminal/His5 region and in His10 (Fig. 6b). When ETD was applied to this 3+ ion, slightly better results in terms of a more complete c-series of ions were obtained compared to ETD for the 2+ ion. However, the first c-type ion found with Pt was c₇. Therefore, the information regarding the attachment of Pt to N-terminal or His5 was lost during ETD fragmentation, unless further MS³ experiments were performed.

In the case of the ion at *m/z* 918.92, [GIVEQC*C*ASVC*SLY + Pt + NH₃]²⁺, fragmentation using CID provided the complete b and y series of ions, yielding either platinated or unplatinated fragment ions and allowing the location of Pt binding sites (Fig. 6c). In contrast, by ETD only Pt-containing fragments were observed and, as can be seen in Fig. 6c, low mass c- and z-ions

(carrying no platinum according to CID experiments) were not seen. In summary, when applying ETD to the fragmentation of Pt-containing peptides, two problems seem to occur: 1) the hampered sequencing by ETD of low charge peptide ions (< 3+) and 2) the absence of some low-molecular weight platinated fragment-ions, which, as revealed by CID, were supposed to be present. As previously described during the fragmentation by ECD of platinated ubiquitin, charge loss may be the reason for the latter behavior: it was proposed that in the cases when Pt may be expected to provide the charge, electron capture by the platinum ion may give rise to neutral fragments not being detectable as positive charges and being absent from the MS/MS spectrum.¹² In addition, the optimization of the experimental conditions for ETD (e.g. activation time) seems to be highly dependent on the peptide fragmented and it should be set for each case, creating an added drawback for its use in LC-MS/MS.

Therefore, ETD may be useful for the fragmentation of certain types of Pt-containing peptides but the results obtained should be revised carefully because some information may be lost regarding Pt-binding sites. Nevertheless, in this case, CID proved to be a more effective fragmentation method for the study of Pt-containing peptides.

Conclusions

The stability of the Pt–insulin bonds after the complete procedure for enzymatic digestion, including the use of denaturing (Urea), reducing (DTT) and alkylating (IAA) reagents, in the presence of a Tris buffer, has been demonstrated. Even when Pt is bound to a cystine, it remains attached to the carbamidomethylated cysteine after the reducing and alkylating steps. Additionally, the use of HIFU has been proved to effectively accelerate the digestion process of Pt-containing proteins, keeping the Pt attached to it, and showing its potential use for this purpose, reducing the total digestion time to 5 min.

The proteomics bottom-up approach based on the described tryptic digestion procedure is suitable for the study of Pt-containing proteins and for elucidating platinum-binding sites in a protein. In fact, this approach allowed the identification of B-Chain N-terminal, His5, His10, Cys7 and A-Chain Cys6, Cys7, Cys20, as Pt binding sites in insulin. There are new reactive sites assigned, not found previously when the top-down approach was used. Minor binding sites are not easy to assign in the high complexity spectra produced when the intact platinated insulin is fragmented by MS/MS. Disulfide bonds, linking A and B chains in the whole protein, are preserved in the gas-phase, making difficult in some cases the visualization of the consecutive fragment ions needed for a correct and unequivocal assignment of sequences. For this reason, the bottom-up approach, especially when dealing with large Pt-containing proteins, would be the method of choice for their study. Moreover, the use of CID for the fragmentation of Pt-peptides is preferred over ETD because it provides more effective fragmentation and more reliable information regarding binding sites.

Finally, free cysteines are the preferential binding sites for Pt in peptides or proteins, although there is not a clear preference in the reactivity of cisplatin with modified cysteines (either cystines or carbamidomethylated cysteines), as it is comparable to the

reactivity shown with either the N-terminus or with histidine residues.

The developed methodology is aimed to be applied on the study and characterization of Pt-proteins interactions on samples relevant to the clinical. In such case, where complex mixtures of proteins are involved, multidimensional separation techniques ought to be used prior to enzymatic digestion, which should be followed by separation and analysis of the peptides generated by LC-ESI-MSⁿ. The parallel use of the highly sensitive and selective technique ICP-MS along the separation processes may help on the location of Pt-containing proteins/peptides. However, the main problem lays on the fact that Pt-containing proteins in clinical samples are minor compared to unmodified proteins, therefore the detection of platinated peptides by LC-ESI-MS after the needed several separation stages may be difficult, so preconcentration steps or even selective enrichment of samples on Pt-bound peptides may be needed. This challenging issue is currently being studied by this group.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Spanish CICYT project CTQ-2008-04873.

References

- 1 B. Rosenberg, L. van Camp and T. Krigas, *Nature*, 1965, **205**, 698–699.
- 2 R. F. Ozols, *Cancer Treat. Rev.*, 1991, **18**, 77–83.
- 3 V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo and J. M. Pérez, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2007, **7**, 3–18.
- 4 D. Esteban-Fernández, E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios and M. M. Gómez-Gómez, *Metallomics*, 2010, **2**, 19.
- 5 P. D. Sadowitz, B. A. Hubbard, J. C. Dabrowiak, J. Goodisman, K. A. Tacka, M. K. Aktas, M. J. Cunningham, R. L. Dubowy and A. H. Souid, *Drug Metab. Dispos.*, 2002, **30**, 183–190.
- 6 A. I. Ivanov, J. Christodoulou, J. A. Parkinson, K. J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow and P. J. Sadler, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 14721–14730.
- 7 I. Khailaila, C. S. Allardyce, C. S. Verma and P. J. Dyson, *ChemBioChem*, 2005, **6**, 1788–1795.
- 8 M. Knipp, S. C. Karotki, G. Natile, P. J. Sadler, V. Brabec and M. Vasak, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 4075–4086.
- 9 R. Mandal and X. F. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 48–52.
- 10 T. Zhao and J. King, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1141–1147.
- 11 C. G. Hartinger, W. H. Ang, A. Casini, L. Messori, B. K. Keppler and P. J. Dyson, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 960–967.
- 12 C. G. Hartinger, Y. O. Tsybin, J. Fuchser and P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 17–19.
- 13 C. Gabbani, A. Casini, G. Mastrobuoni, N. Kirshenbaum, O. Moshel, G. Pieraccini, G. Moneti, L. Messori and D. Gibson, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 755–764.
- 14 V. Calderone, A. Casini, S. Mangani, L. Messori and P. L. Orioli, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 1267–1269.
- 15 E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios and M. M. Gómez-Gómez, *Anal. Chem.*, 2009, **81**(9), 3507–3516.
- 16 J. Will, D. A. Wolters and W. S. Sheldrick, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 1696–1707.
- 17 D. Gibson and C. E. Costello, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 1999, **5**, 501–510.
- 18 J. M. Wells and S. A. McLuckey, *Methods Enzymol.*, 2005, **402**, 148–185.
- 19 B. Paizs and S. Suhai, *Mass Spectrom. Rev.*, 2005, **24**(4), 508–548.
- 20 P. Roepstorff and J. Fohlman, *Biol. Mass Spectrom.*, 1984, **11**(11), 601.
- 21 R. A. Zubarev, N. L. Kelleher and F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**(13), 3265–3266.
- 22 J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz and D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**(26), 9528–9533.
- 23 J. Liu, H. P. Gunawardena, T. Huang and S. A. McLuckey, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2008, **276**, 160–170.
- 24 L. M. Mikesch, B. Ueberheide, A. Chi, J. J. Coon, J. E. P. Syka, J. Shabanowitz and D. F. Hunt, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2006, **1764**, 1811–1822.
- 25 A. P. Ryle, F. Sanger, L. F. Smith and R. Kitai, *Biochem. J.*, 1955, **60**, 542–556.
- 26 D. López-Ferrer, J. L. Capelo and J. Vázquez, *J. Proteome Res.*, 2005, **4**, 1569–1574.
- 27 R. J. Carreira, F. M. Cordeiro, A. J. Moro, M. G. Rivas, R. Rial-Otero, E. M. Gaspar, I. Moura and J. L. Capelo, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1153**, 291–299.
- 28 H. M. Santos, R. Rial-Otero, L. Fernandes, G. Vale, M. G. Rivas, I. Moura and J. L. Capelo, *J. Proteome Res.*, 2007, **6**(3393), 3399.

Novel insights into the bottom-up mass spectrometry proteomics approach for the characterization of Pt-binding proteins: the insulin-cisplatin case study

Estefanía Moreno-Gordaliza, Benito Cañas*, María A. Palacios, M. Milagros Gómez-Gómez

Department of Analytical Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda.

Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

*Corresponding author: Dr. Benito Cañas. E-mail: bcanas@quim.ucm.es. Fax: +34913944329

SUPPLEMENTARY DATA

The present document provides further information on the paper mentioned above.

Contents:

- Figures S-1 to S-10

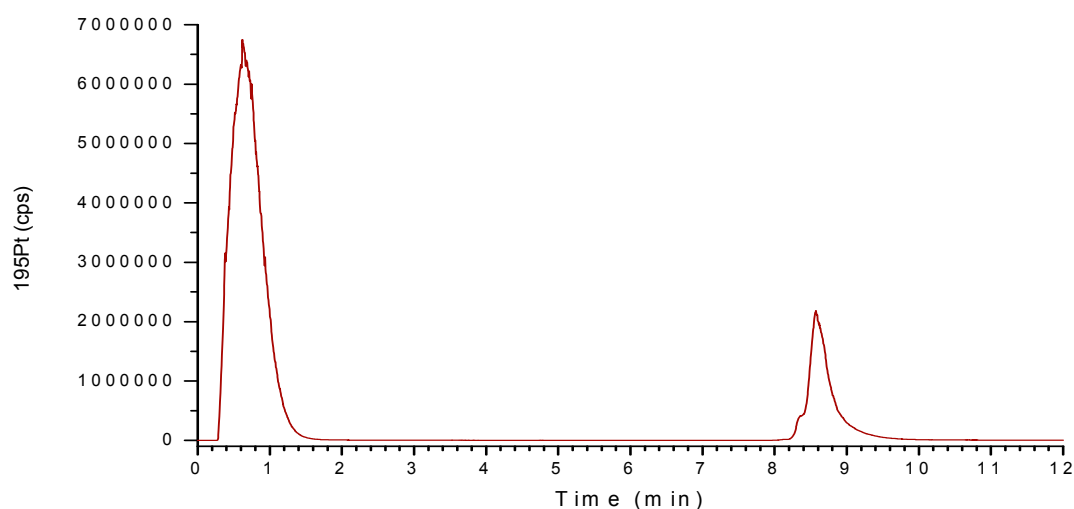


Figure S-1. HPLC(RP)-ICP-MS chromatogram showing the separation of unreacted cisplatin ($t_r = 0.3$ -1.3 min) from insulin-cisplatin adducts (t_r : 8.2-9.2 min). ^{195}Pt was monitored.

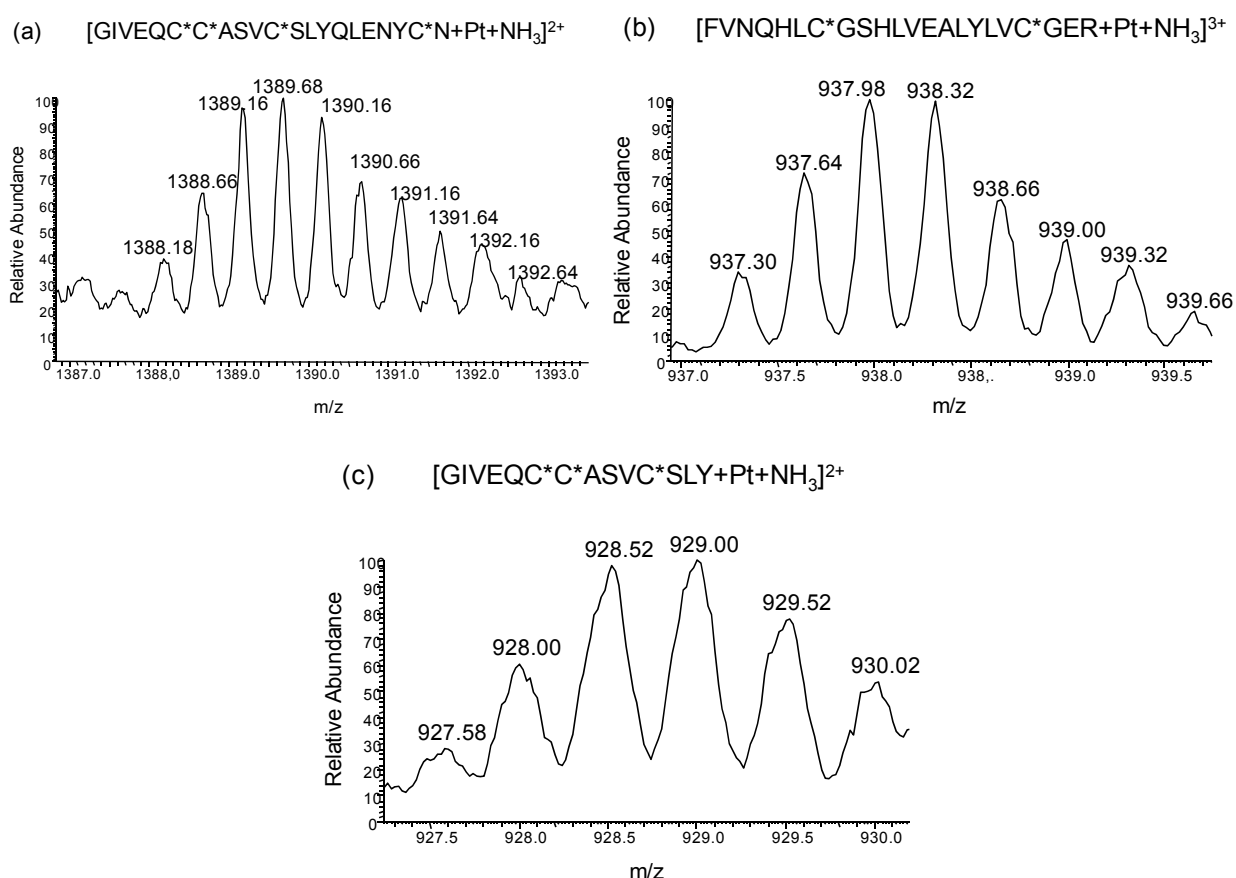


Figure S-2. Some platinum-bound peptide ions observed in the nESI-LIT MS of in a complete tryptic digestion of isolated insulin-cisplatin adducts (including previous treatment with Urea, DTT and IAA). These ions correspond to: (a) $[\text{GIVEQC}^*\text{C}^*\text{ASVC}^*\text{SLYQLENYC}^*\text{N}+\text{Pt}+\text{NH}_3]^{2+}$ at m/z 1388.18, (b) $[\text{FVNQHLC}^*\text{GSHLVEALYLVC}^*\text{GER}+\text{Pt}+\text{NH}_3]^{3+}$ at m/z 937.30, (c) $[\text{GIVEQC}^*\text{C}^*\text{ASVC}^*\text{SLY}+\text{Pt}+\text{NH}_3]^{2+}$ at m/z 927.58.

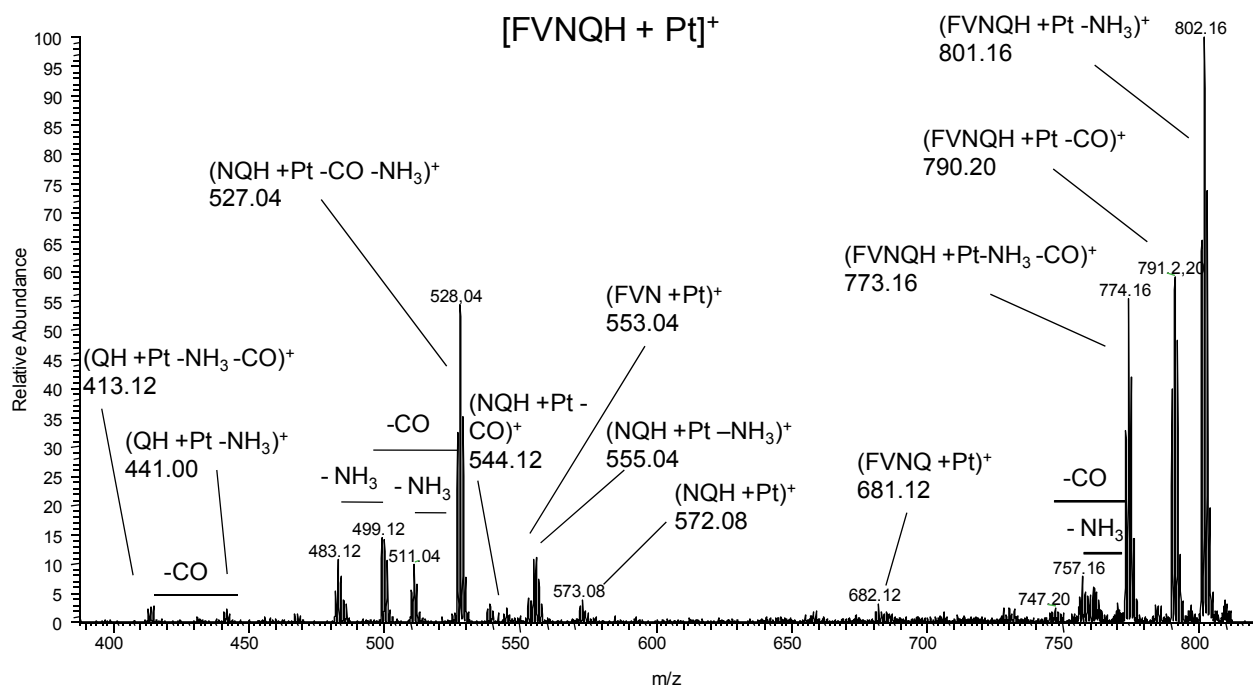


Figure S-3. CID-MS³ of the platinated fragment ion at m/z 818.00 (1+) observed in the MS² of the platinum-containing peptide at m/z 1048.5 (2+). Transition: 1048.50(2+) → 818.16 (1+). The sequence of the precursor ion and the main fragment ions are shown.

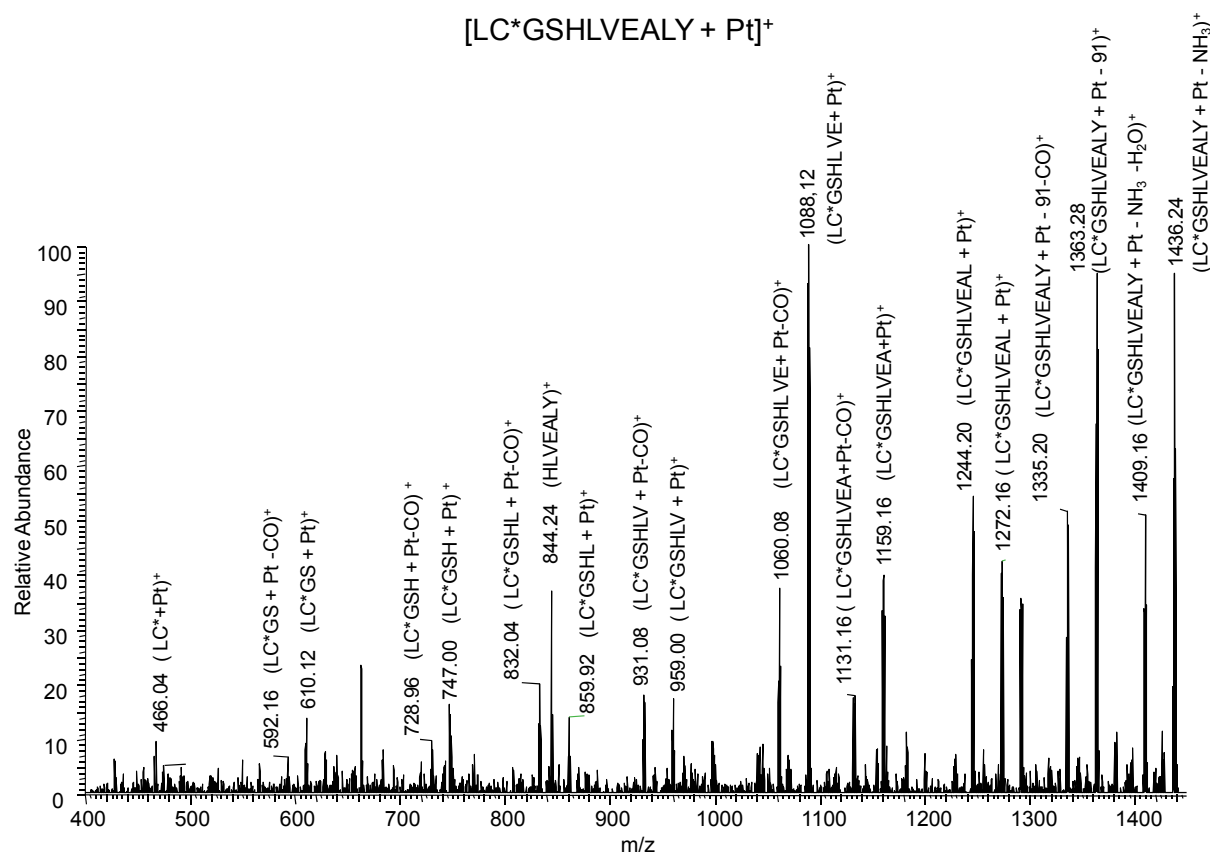


Figure S-4. CID-MS³ of the platinated fragment ion at m/z 1453.52 (1+) observed in the MS² of the platinum-containing peptide at m/z 1048.50 (2+). Transition: 1048.50(2+) → 1453.52 (1+). The sequence of the precursor ion and the main fragment ions are shown.

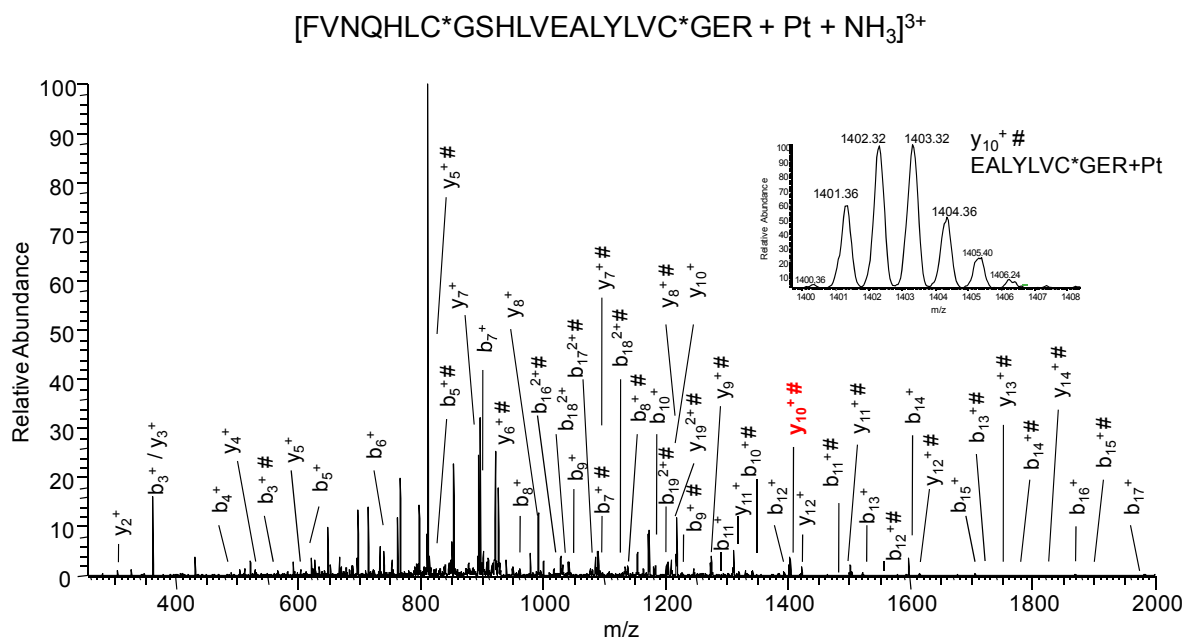
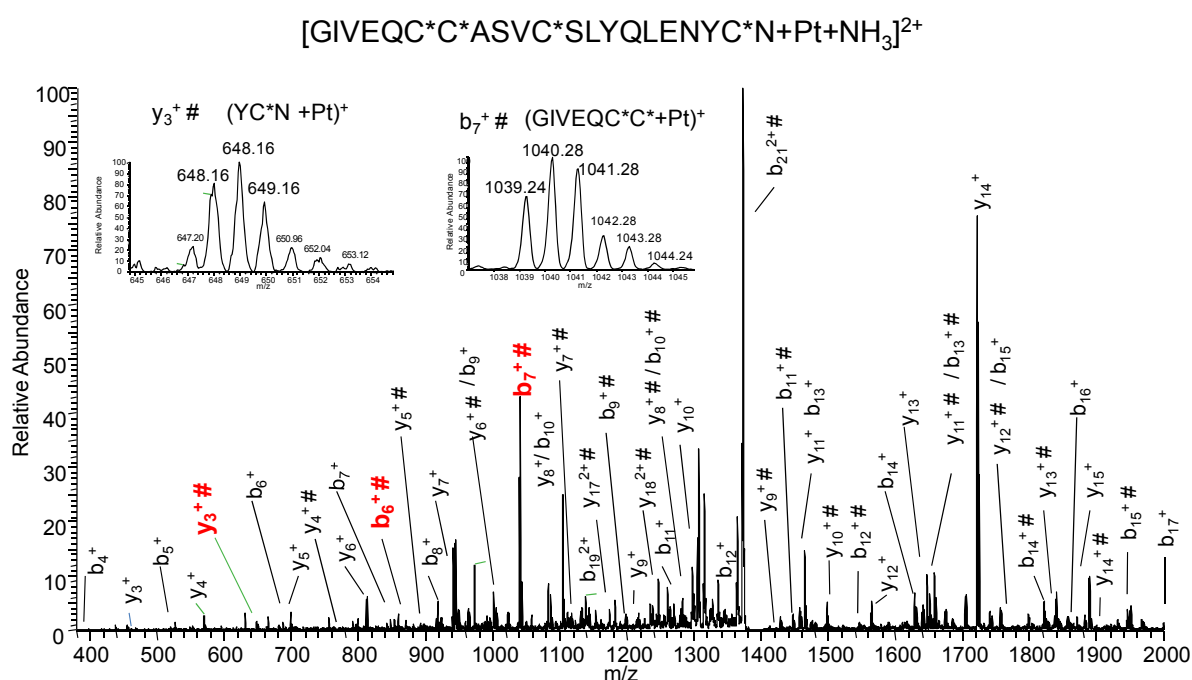


Figure S-5. CID-MS² spectrum for the 3+ ion at m/z 937.30, corresponding to $[FVNQHLC*GSHLVEALYLVC*GER+Pt+NH_3]^{3+}$, observed in the nESI-LIT MS analysis of a complete overnight tryptic digestion of isolated insulin-cisplatin adducts. # denotes a platinum-containing fragment ion. Inset: platinum-containing fragment ion observed at m/z 1401.36 (1+). The sequence of the precursor ion is shown and the main fragment ions have been assigned.



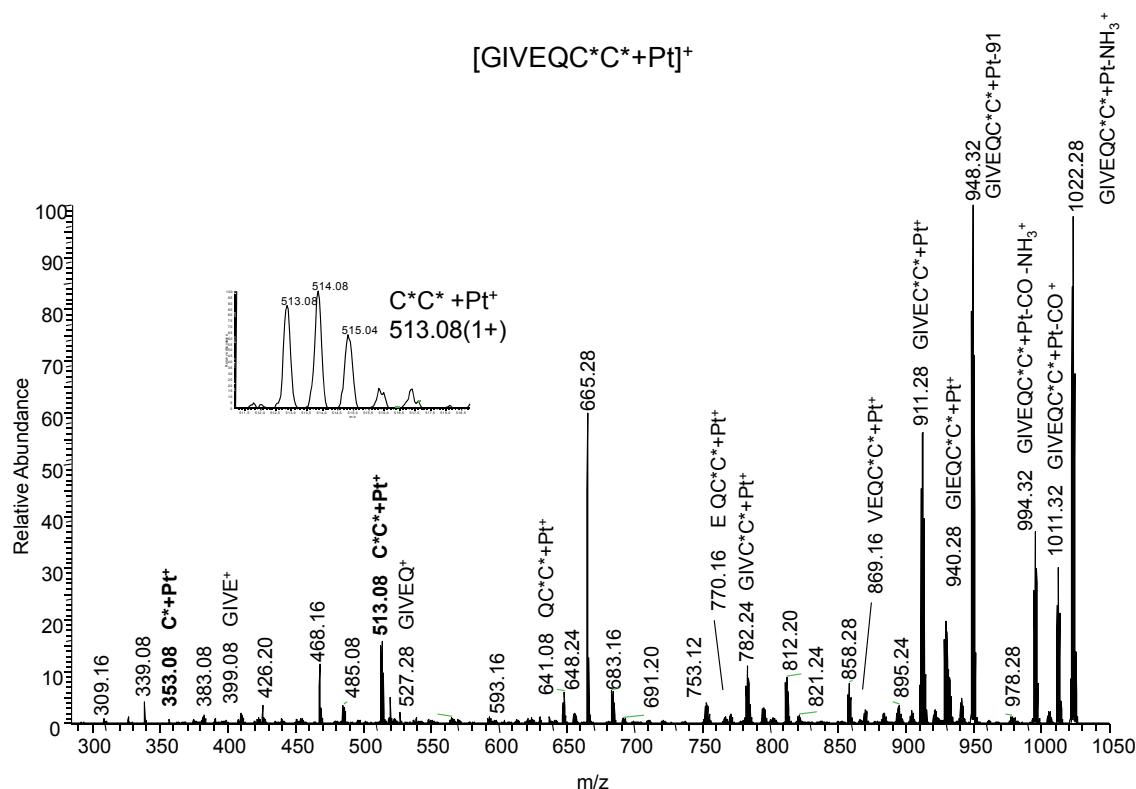


Figure S-7. CID-MS³ of the platinated fragment ion at m/z 1039.24 (1+) observed in the MS² of the platinum-containing peptide at m/z 1388.18 (2+). Transition: 1388.18(2+) \rightarrow 1039.24 (1+). The sequence of the precursor ion and the main fragment ions are shown. Inset: Pt- fragment ion at m/z 513,08 (1+).

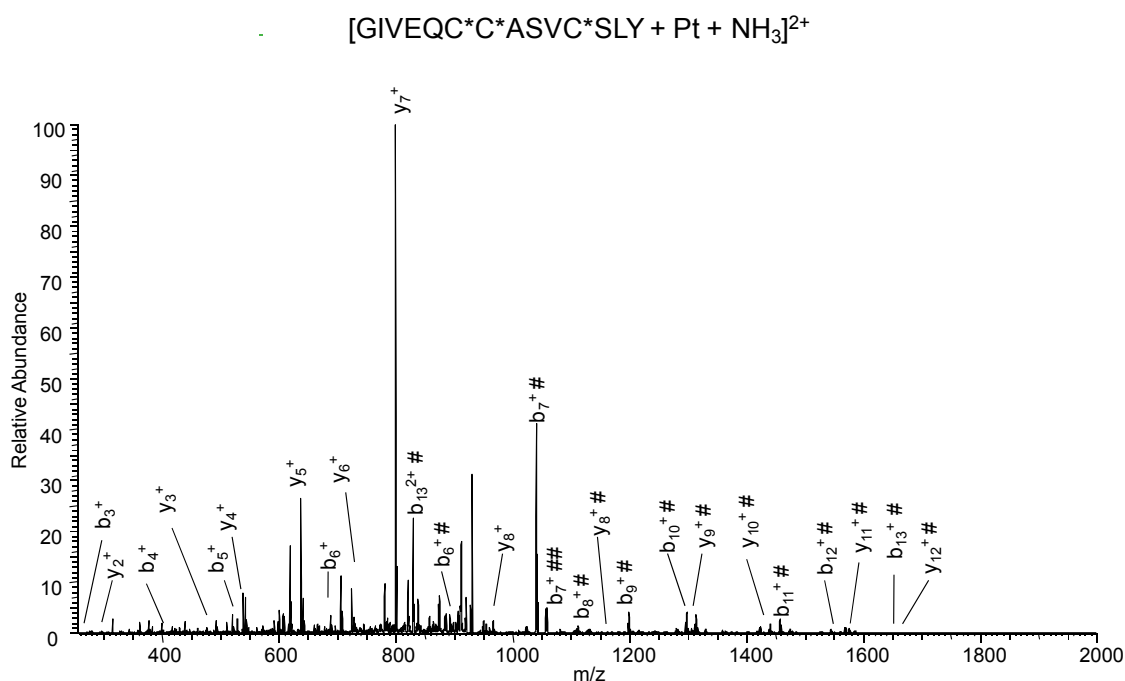


Figure S-8. CID-MS² spectrum for the 2+ ion at m/z 927.58, corresponding to $[GIVEQC*C*ASVC*SLY+Pt+NH_3]^{2+}$, observed in the nESI-LIT MS analysis of a complete overnight tryptic digestion of isolated insulin-cisplatin adducts. # denotes a platinum-containing fragment ion. The sequence of the precursor ion is shown and the main fragment ions have been assigned. # denotes platinum-containing ions.

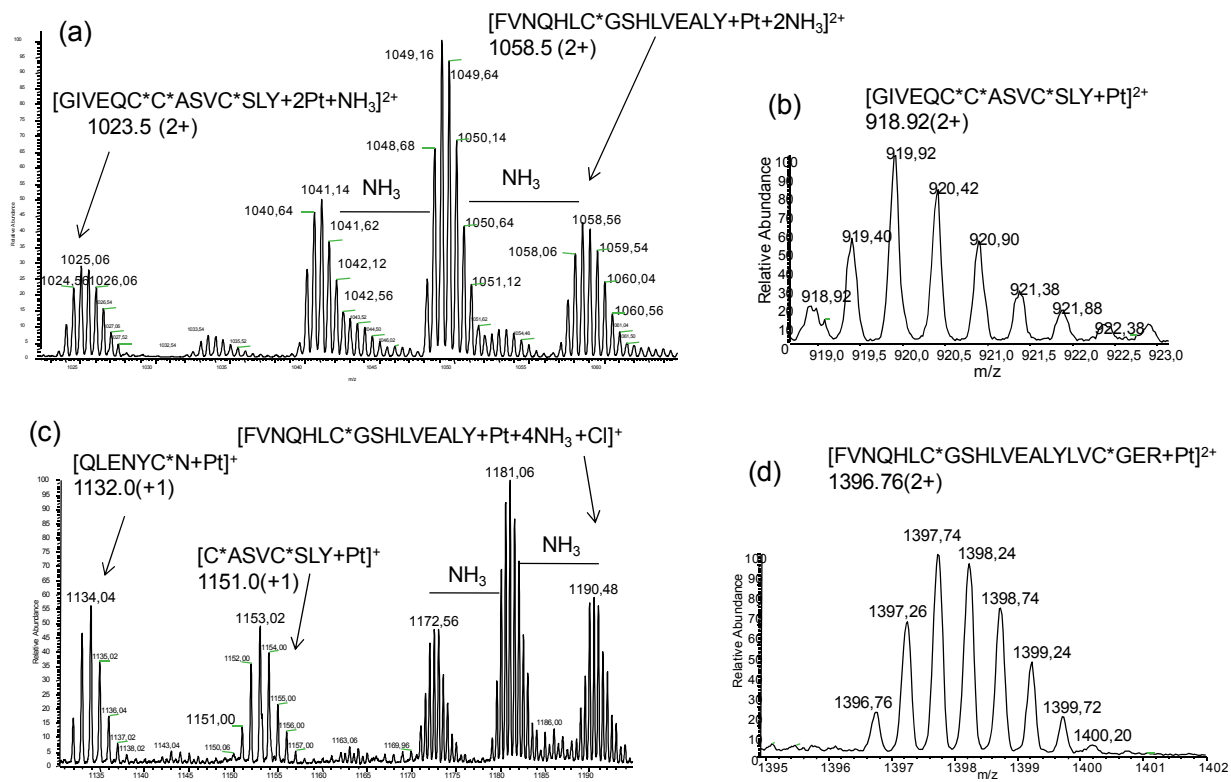


Figure S-9. (a,b,c,d) Zoom scans of platinum-containing ions observed in the nESI-LIT MS of a 1:5 incubation of tryptic insulin peptides with cisplatin (0.1%TFA, 37°C, 96h).

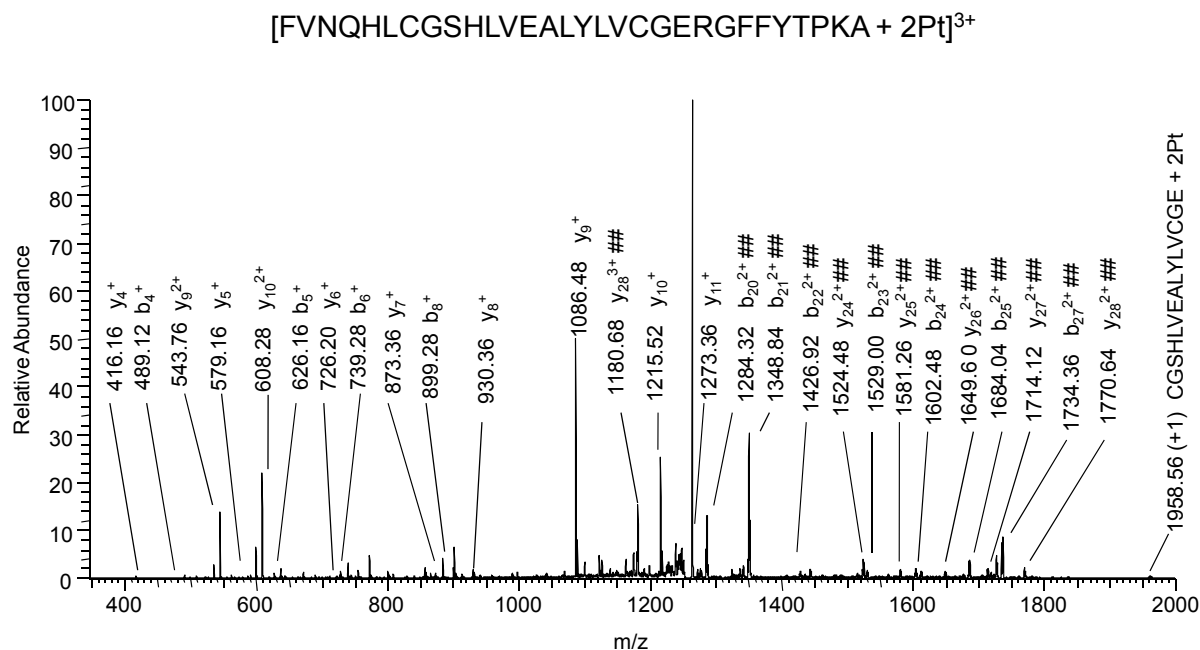


Figure S-10. CID-MS² spectrum for the diplatinated ion at m/z 1261.36 (3+), corresponding to $[FVNQHLCGSHLVEALYLCGERGFFYTPKA + 2Pt]^{3+}$, observed in the nESI-LIT MS analysis of a insulin treated with 8M Urea and 10 mM DTT followed by incubation with an excess of cisplatin. The sequence of the precursor ion is shown and the main fragment ions have been assigned. ## represents diplatinated ions.

III.2. METODOLOGÍAS BIOANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON CISPLATINO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMPLEJAS

III.2. METODOLOGÍAS BIOANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON CISPLATINO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMPLEJAS

Para llevar a cabo la identificación de proteínas platinadas en muestras biológicas constituidas por mezclas proteicas complejas, será necesario realizar separaciones multidimensionales previas a la determinación estructural. Además, considerando las bajas concentraciones de aductos platinados en dichas matrices, será imprescindible emplear técnicas analíticas de alta sensibilidad. En vista de los resultados obtenidos en la sección III.1, la aplicación de una metodología de espectrometría de masas “*bottom-up*” para la identificación de complejos platino-proteínas es factible y facilita su completa caracterización. Por este motivo, se plantea el desarrollo de una metodología basada en el análisis “*bottom-up*”, efectuando separaciones proteicas mediante electroforesis bidimensional en gel (2-DE), la cual ofrece grandes prestaciones como la capacidad de separación de miles de proteínas en un solo gel. Sin embargo, dada la cierta labilidad de los complejos metal-proteínas, es conveniente examinar los reactivos y optimizar las condiciones empleadas durante los procesos separativos y preparativos previos al análisis final por MS, para seleccionar el método más adecuado para efectuar su identificación en muestras biológicas. Si bien, como se ha visto en la sección 2.4.2.3., existen algunos estudios previos en relación al efecto sobre las proteínas con platino de ciertos reactivos utilizados durante la 2-DE, los resultados no son del todo concluyentes.

Por tanto, en esta sección se planteó un examen exhaustivo nunca antes abordado de todos los factores mencionados, tanto durante las separaciones 2-DE como durante posteriores procesos de fijación, tinción, destinción de las proteínas separadas; tratamiento de los geles para su análisis por LA-ICP-MS; como digestión en gel de spots con platino y análisis mediante nHPLC-ESI-MS/MS; que permita elaborar una metodología para el análisis de proteínas ligadas a platino. La metodología se evaluó y desarrolló sobre distintas proteínas modelo (transferrina, albúmina, anhidrasa carbónica, mioglobina y citocromo c) que presentan diferentes tamaños, complejidades y grupos potencialmente reactivos frente a cisplatino, incubadas con el fármaco. Finalmente se aplicó la metodología a muestras de relevancia clínica. En el esquema experimental 2 se resumen los ensayos realizados en esta sección.

El trabajo 4 (“**OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins**” *Journal of Chromatography A* (2011), 1218, 1281-1290) sirvió para establecer las bases para el desarrollo de una metodología para la separación mediante 2-DE de proteínas con platino, basada en el uso de OFFGEL-IEF y de SDS-PAGE. Por

un lado, se efectuaron experimentos empleando ultrafiltración con filtros de corte seguida del análisis de Pt total en los retenidos y filtrados mediante ICP-MS con el fin de determinar el Pt que permanecía unido a proteínas tras la incubación de aductos HSA-Pt con diversos reactivos y disoluciones empleadas en PAGE, IEF, e incluso en la fijación y tinción de geles y en la digestión proteica. Asimismo, empleando ICP-MS se estudió la recuperación de Pt en geles PAGE o fracciones de OFFGEL tras la separación de los cinco modelos proteicos platinados antes mencionados bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, o no, y tras la mineralización de bandas de gel en el caso de PAGE. Asimismo, se comparó la recuperación de Pt unido a proteínas en fracciones de OFFGEL tras la separación en diferentes condiciones de proteínas citosólicas de riñón de una rata tratada con 16 mg m⁻² de cisplatino.

En el trabajo 5 (**“Characterization of Pt-protein complexes by nHPLC-ESI-LTQ MS/MS using a gel-based bottom-up approach”** *Talanta* (2012), 88, 599-608) se evaluó la resistencia de los complejos Pt-proteínas a los procesos implicados en la digestión en gel sobre los cinco modelos proteicos platinados seleccionados, tras su separación por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Además se estudió la información estructural conservable y obtenible tras el análisis de los digeridos por nHPLC-ESI-LTQ MS/MS, conduciendo a la localización de sitios de unión de Pt en las proteínas modelo y se compararon con aquellos obtenidos mediante la digestión en disolución de los complejos Pt-proteínas. Los sitios de unión hallados se analizaron considerando la estructura tridimensional de las proteínas en base a modelos CPK obtenidos de la base de datos RCSB PDB.

Finalmente, el trabajo 6 (**“LA-ICP-MS and nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS for the analysis of cisplatin-protein complexes separated by two dimensional gel electrophoresis in biological samples”**, enviado a la revista *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*) se realizó durante una estancia realizada en el contexto de esta tesis en el grupo del Prof. Linscheid en la Humboldt Universitaet zu Berlin, en colaboración con el grupo del Dr. Jakubowski en el Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) de Berlín, Proteome Factory AG (Berlín) y el grupo del Dr. Tejedor del Hospital Gregorio Marañón de Madrid. Este trabajo se centra en el desarrollo de una metodología para la localización de proteínas con platino tras su separación en geles 2-DE, utilizando LA-ICP-MS, que facilite la elección de los spots del gel de interés para su digestión posterior e identificación de las proteínas ligadas a platino mediante nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS, completando así la metodología iniciada en los dos anteriores trabajos. En este caso, se evaluaron las posibles estrategias para el pretratamiento del gel previo a la ablación láser (transferencia de las proteínas a membranas o secado de los geles). El uso de esta herramienta de análisis elemental permitió crear mapas completos de distribución de Pt en el

gel y además posibilitó profundizar en las condiciones de separación y en la posibilidad de la tinción de los geles con Coomassie o plata para el estudio del Pt-proteoma. Aunque el desarrollo metodológico se efectuó sobre los cinco modelos proteicos antes citados, la metodología se aplicó al estudio de proteínas con platino de una muestra de suero de rata tratada con 16 mg kg^{-1} de cisplatino y de un citosol celular de RPTECs tratadas con 1 mM de cisplatino, de gran relevancia desde el punto de vista de la nefrotoxicidad inducida por el fármaco.

Esquema experimental 2

Muestras

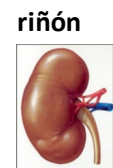
Incubaciones

HSA, TF, CA,
MYO, CYT C,

proteínas cisplatino



HSA-Pt
TF-Pt
CA-Pt
MYO-Pt
CYT C-Pt

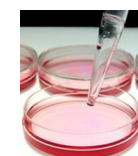


Suero
sanguíneo

Ratas

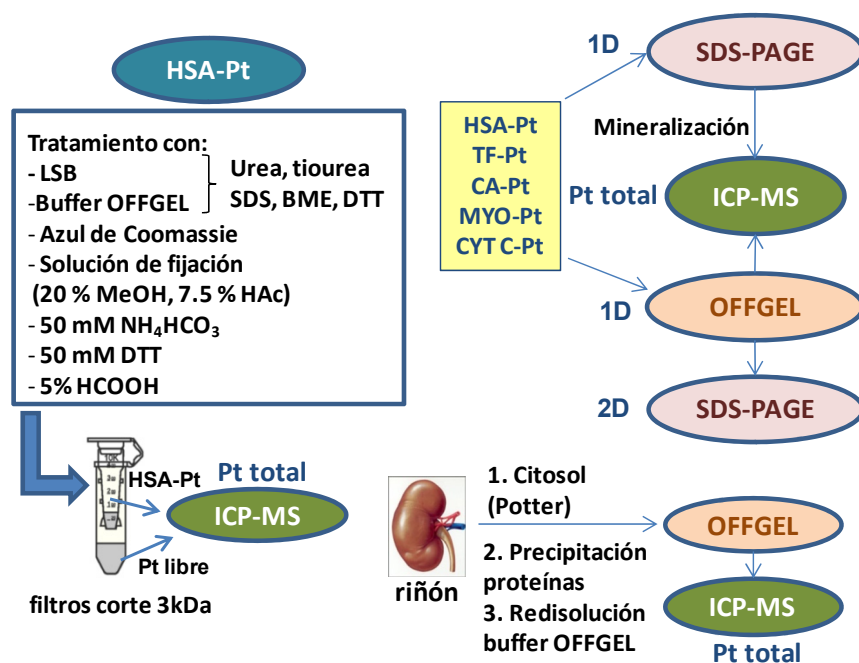


Cultivos celulares

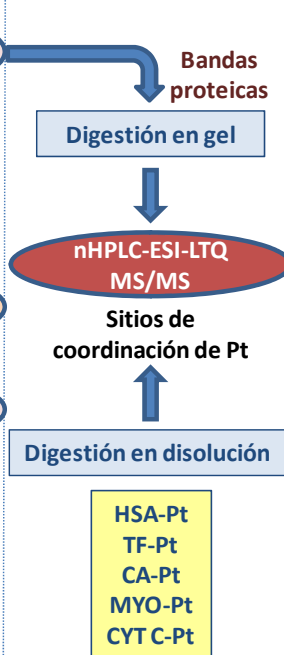


RPTECs
+ 1mM
cisplatino
↓
citósol

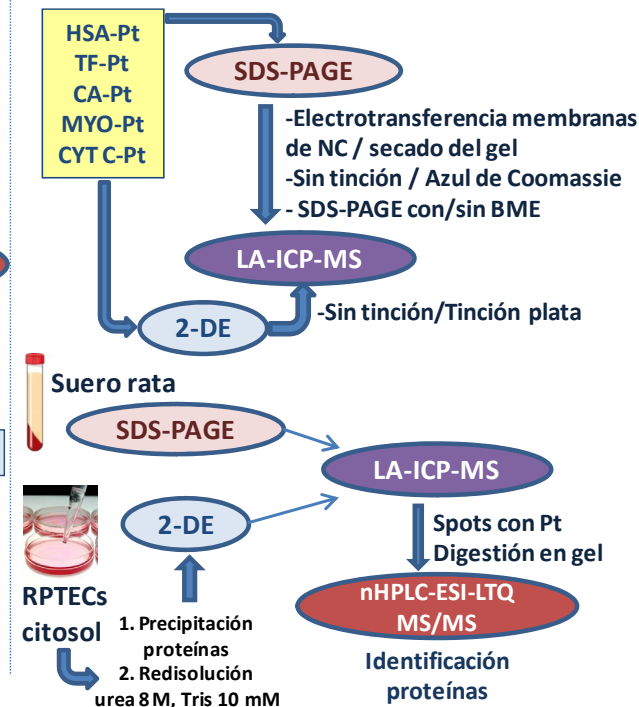
TRABAJO 4



TRABAJO 5



TRABAJO 6



Trabajo 4

“OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins”

Journal of Chromatography A (2011), 1218, 1281-1290

Los resultados de este trabajo fueron presentados como Comunicaciones en formato Póster en la “Winter Conference on Plasma Spectrochemistry” celebrada en Zaragoza (España) en Febrero de 2011 y en el “Proteomic Forum” celebrado en Berlín (Alemania) en Abril de 2011



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins

M^a Luz Mena, Estefanía Moreno-Gordaliza, Irene Moraleja, Benito Cañas*, M^a Milagros Gómez-Gómez

Analytical Chemistry Department, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2010

Received in revised form

26 December 2010

Accepted 30 December 2010

Available online 6 January 2011

Keywords:

OFFGEL-IEF

SDS-PAGE

Platinum-binding proteins

ICP-MS

MALDI-TOF-MS

ABSTRACT

In this work a 2D electrophoretic separation procedure able to maintain the integrity of platinum–protein bonds has been developed. The method is based on the use of sequential OFFGEL isoelectric focussing (IEF) and PAGE. A systematic study of the reagents used for PAGE, for OFFGEL-IEF separation, and post-separation treatment of gels (such as enzymatic digestion and sample preparation for MS analysis) was tackled regarding their suitability for the identification of platinum binding proteins using standard proteins incubated with cisplatin. The distribution of platinum in high and low molecular weight fractions (separated by cut-off filters) was determined by ICP-MS, which allows evaluating platinum–protein bond stability under the conditions studied. SDS-PAGE in the absence of β -mercaptoethanol or dithiotreitol preserved the platinum–protein bonds. In addition, neither the influence of the electric field during the electrophoretic separation, nor the processes of fixing, staining and destaining of proteins in the gel did result in the loss of platinum from platinum binding proteins. SDS-PAGE under non-reducing conditions provides separation of platinum-binding proteins in very narrow bands with quantitative recoveries. Different amounts of platinum-bound proteins covering the range 0.3–2.0 μ g were separated and mineralised for platinum determination, showing good platinum linearity. Limits of detection for a mixture of five standard proteins incubated with cisplatin were between the range of 2.4 and 13.9 pg of platinum, which were satisfactory for their application to biological samples. Regarding OFFGEL-IEF, a denaturing solution without thiourea and without dithiotreitol is recommended. The suitability of the OFFGEL-IEF for the separation of platinum binding proteins of a kidney cytosol was demonstrated.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Platinum-based antitumor drugs (cisplatin ($\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), carboplatin and oxaliplatin) are widely used for the therapy of various types of cancer (e.g. brain, breast, ovarian, prostate, colon) [1]. Severe side effects (nephrotoxicity, ototoxicity, emetogenesis and neurotoxicity) as well as acquired drug resistance, have often been reported during application of these drugs [2,3]. Only little is known about the molecular principles of these effects. A closer look at the specific binding of platinum to proteins in living organisms [4,5] may shed some light on these mechanisms. However, separation methods have to be developed for the preparation, for structural analysis, of very complex biological samples containing hundreds of proteins that may bind to platinum along with other many non-Pt-bound proteins.

At present, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) is a powerful separation technique, which allows separation of thousands of proteins in biological research [6,7]. Based on two

distinct procedures, it combines isoelectric focusing (IEF), which separates proteins according to their isoelectric point (pI), and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), which separates them further according to their molecular mass. The separated proteins in 2-DE gels are visualised by, e.g. Coomassie Blue or silver staining, excised, digested with trypsin and identified by matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) or by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry/mass spectrometry (HPLC–ESI-MS/MS) resulting in the principal workflow of the proteomic analysis [8]. Other methodologies may be used for the separation of proteins, but if chromatography is employed, it should be multidimensional involving the use of reverse phase, which may be problematic for the quantitative recovery of a mixture of proteins with broad physical–chemical characteristics. On the other hand, higher resolution can be achieved using capillary electrophoresis but it is not useful for preparative purposes.

It has to be remarked that 2-DE was originally designed for the characterisation of proteins without regard for the trace elements which they may be carrying. However, there is no method for a detailed characterisation of metal–protein complexes in liv-

* Corresponding author. Tel.: +34 913944368; fax: +34 913944329.

E-mail address: bcanasmo@quim.ucm.es (B. Cañas).

ing organisms, and the suitability of these methods will depend strongly on the stability of the metal–protein bond, especially using SDS-PAGE. Because of this, the main problem researchers have to face is that it is not always possible to keep these metal-bound protein complexes intact during separation and post-separation processes, and metal losses may occur. Some authors have already discussed these metal losses in different proteins, and in most cases the use of native- or Blue native-PAGE instead of SDS-PAGE, has been proposed to solve the problem [9–13].

Regarding IEF, fractionation under well-established denaturing conditions (urea, thiourea, DTT, ampholytes and glycerol) has also been widely reported for proteomic studies, including the use of immobilised pH gradient gels (IPG IEF) [14] or solution isoelectric focusing (sIEF) [15], which presents the advantage that the sample is recovered in liquid phase. Commercial sIEF systems can be classified according to the way in which the pH gradient is created, namely, through carrier ampholytes, or through the use of isoelectric membranes, and consequently, to how proteins are confined within the gradient. In the case of Agilent's OFFGEL system [16,17], which has been used for the experiments described in the present work, the pH gradient is formed through isoelectric membranes. The OFFGEL system presents the capability of generating stable pH gradients, an effective barrier between successive chambers and superior focusing to those employing carrier ampholytes.

In contrast, there are very few reports on native IEF. Shang et al. [18] successfully performed native IEF on myoglobin and yeast soluble proteins. However, the applicability of this approach to the study of metalloproteome has not been fully investigated. Recently, Pioselli et al. [19] separated mixtures of metalloproteins containing copper, zinc and iron by sIEF with a five-well system under well-established denaturing, and novel non-denaturing separation conditions. Denaturing conditions separate the metalloprotein mixtures with high resolution, although the stability of the complexes was affected. However, non-denaturing conditions showed a lower degree of resolution in the separation, but the stability of the metal–protein complexes was preserved.

The analytical approaches for platinum binding proteins have been recently reviewed by Esteban-Fernández et al. [20]. The use of native 2-DE has been reported by Lustig et al. [21,22] for the separation of human and rabbit serum incubated with PtCl_4^{2-} . They concluded that platinum binds very strongly to various serum proteins such as albumin, transferrin and globulin and the binding seems to be strong enough to withstand the electric field, the IEF and the native-PAGE. Moreover, Ma et al. [23] also studied platinum-binding serum proteins after native-PAGE, obtaining representative platinum signals for these proteins. However, for complex samples, SDS-PAGE is preferred due to its higher resolution and reproducibility.

The stability and the strength of the platinum–protein bond in the presence of chemicals, such as urea, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), dithiotreitol (DTT) and SDS have been evaluated by several authors [22,24,25]. Lustig et al. [22] demonstrated, for rabbit serum incubated with PtCl_4^{2-} , the possibility of using urea, even at high concentrations (9 M), and SDS only at concentrations lower than 0.1%, while CHAPS and DTT could not be used at all. However, recently Moreno-Gordaliza et al. [24] demonstrated that the platinum–protein bonds in an insulin-cisplatin model resisted the action of the denaturing and reducing agents (such as urea 8 M and DTT 10 mM) in a Tris buffer, remarking the significant strength of the platinum–protein bonds. Esteban-Fernández et al. [25] also studied the stability and strength of the bond by subjecting the cytosolic fraction of kidney and ear impacted by cisplatin to several treatments common in gel electrophoresis, employing SDS, β -mercaptoethanol (BME), heating and sonication. Analysis by size exclusion chromatography–inductively coupled plasma–mass

spectrometry (SEC–ICP–MS) revealed that biomolecule–cisplatin interactions resisted denaturing and reducing conditions, based on the absence of the peak corresponding to free cisplatin in the treated samples and in the non-significant differences in the chromatographic profiles for treated and untreated samples.

Indeed, gel electrophoresis has already been successfully applied for the separation of cisplatin-containing proteins in biological samples. In particular, Allardyce et al. [26] administered cisplatin to *Escherichia coli* cells, and proteins were partially separated by non-reducing SDS-PAGE, followed by a platinum analysis by laser ablation (LA)–ICP–MS. Membrane proteins were identified in a platinum-rich electrophoretic band by reversed phase-electrospray ionisation–time of flight (RP-ESI-Q-TOF), after an in-gel tryptic digestion. In this case, the outer membrane protein A (ompA) was identified and was proposed to be involved in the cellular cisplatin intake.

On the other hand, not only the nature of the electrophoretic (native or SDS) process may alter the metal–protein binding. There are few studies regarding the influence of other extra-electrophoretic conditions (including post-separation process) on possible metal–protein binding break. Using synchrotron radiation X-ray fluorescence as detection system after SDS-PAGE, Gao et al. [27] found that not only the influence of the electric field during electrophoresis separation, but also the processes of fixing, staining and destaining of proteins in the gel may result in loss of metal ions (such as Cu, Fe and Zn) from metalloproteins in human liver cytosol. Recently, Raab et al. [28] found that staining of the gel prior to LA-ICP–MS is not recommended, since most of the protein-bound metal is lost during the staining procedure (except when it is covalently bound), and should be avoided prior to ablation. They also found that native gel electrophoresis is the most suitable technique to separate metal–protein complexes and preparation for metal detection and quantification by LA-ICP–MS.

The aim of this study is to determine the most appropriate separation conditions for 2-DE based on the sequential use of PAGE and OFFGEL-IEF of proteins containing platinum, and to define general parameters for post-separation treatments to make the proteins suitable for structural MS analysis, preserving the platinum–protein bonds along the whole analytical procedure. The location and quantification of platinum in the gel or in the wells after OFFGEL-IEF separation of a mixture of standard proteins incubated with cisplatin, may allow evaluating platinum–protein bond stability under the conditions needed for both separation techniques. To quantify the platinum remaining bound to the protein after 2-DE and to evaluate the origin of possible platinum losses, a model protein, HSA, was incubated with cis-Pt and subjected to each of the procedures implicated in these separations. After the incubation of the HSA–Pt complexes with the different reagents used in PAGE, or in OFFGEL-IEF, or in post-separation treatments, solutions were subjected to ultrafiltration through 3 kDa cut-off filters and platinum was measured by ICP–MS. In addition, the isoelectric fractionation of a kidney tissue extract from a rat treated with cis-Pt was performed to study the recovery of protein-bound Pt under the optimal conditions investigated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The platinum-based drug used was cisplatin (Sigma Aldrich Chemie, St. Louis, MO). Human apo-transferrin (TF), human serum albumin (HSA), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (CA), myoglobin from horse heart (MYO) and cytochrome c from horse heart (CYT C) were also purchased from Sigma Aldrich. Sodium chloride (Panreac Química, SA, Barcelona, Spain) and 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol Tris (Sigma Aldrich Chemie, St.

Table 1

Recoveries for HSA-cisPt expressed as percentage of platinum, after ultrafiltration, mixed 1 + 1 with the different reagents given in the table tested under: A) non-denaturing or denaturing and/or reducing PAGE, B) OFFGEL-IEF or C) during in gel digestion with trypsin. In all the cases, the relative standard deviation is lower than 3% for three determinations.

Reagents	Reaction time (min)	Protein-bound Pt (%)	Non-protein-bound Pt (%)
A. Reagents used under non-denaturing or denaturing PAGE			
(A1) Native buffer ^a	5	94	6
(A2) LSB ^b	5	98	2
(A3) LSB	60	88	12
(A4) LSB (95 °C)	5	98	2
(A5) LSB (95 °C)	60	91	9
(A6) BME (5%)	5	92	8
(A7) BME (5%)	24 h	80	20
(A8) LSB with BME	5	91	9
(A9) LSB with BME	60	65	35
(A10) LSB with BME (95 °C)	1	87	13
(A11) LSB with BME (95 °C)	5	64	36
(A12) LSB with BME (95 °C)	60	41	59
(A13) LSB with DTT	5	96	4
(A14) LSB with DTT (95 °C)	1	95	5
(A15) Running buffer ^c	60	100	0
(A16) Bio-Safe™ Coomassie stain	60	92	8
(A17) Fixing solution	60	98	2
B. Reagents used under OFFGEL-IEF			
(B1) Thiourea (2.5 M)	5	57	43
(B2) Thiourea (2.5 M)	24 h	61	39
(B3) DTT (5%)	5	87	13
(B4) DTT (5%)	24 h	85	15
(B5) Denaturing solution (DS) ^d	16 h	57	43
(B6) DS without DTT	24 h	68	34
(B7) DS without thiourea	24 h	79	23
(B8) DS without thiourea and DTT	24 h	98	2
C. Reagents used during in gel digestion with trypsin			
(C1) NH ₄ HCO ₃ (50 mM, 22 °C)	60	99	1
(C2) NH ₄ HCO ₃ (25 mM, 22 °C)	60	99	1
(C3) NH ₄ HCO ₃ (25 mM, 37 °C)	16 h	93	7
(C4) Tris-HCl pH 7.8 (25 mM, 37 °C)	16 h	94	6
(C5) Formic acid 5%	60	98	2

^a Composition of Native buffer (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glycerol 40%, bromophenol blue 0.01%).

^b Composition of Laemmli sample buffer (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glycerol 25%, SDS 2%, bromophenol blue 0.01%).

^c Composition of running buffer (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glycine 192 mM, SDS 0.1%).

^d Composition of denaturing solution (DS): urea 8 M, thiourea 2.5 M, DTT 0.08 M, ampholytes and glycerol.

Louis, MO) were used for the preparation of the incubation solution under physiological conditions.

High-purity HNO₃, used both for the pH adjustment of the previously mentioned incubation media and for the mineralisation of the electrophoretic gels, and HCl were obtained by distillation of the analytical-grade reagents (Merck, Darmstadt, Germany) in an acid distiller (Berghof B BSB-939IR, Eningen, Germany). Hydrogen peroxide (30%, w/v, Panreac Química SA, Barcelona, Spain) was used for sample digestion. Stock solutions of platinum and iridium (1000 mg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Germany) were diluted with HCl (0.24 mol L⁻¹) to prepare ICP-MS standard solutions. Working solutions were prepared daily and diluted with HCl (0.24 mol L⁻¹) to final concentration. All solutions were prepared with deionised water (Milli-Q Ultra pure water systems, Millipore, USA).

2.2. In vitro incubations and protein quantification

To reproduce the physiological intracellular saline and pH conditions, TF, HSA, CA, MYO and CYT C (62 μM) were incubated, separately, with cisplatin (620 μM) at a molar ratio 1:10 in a buffer containing NaCl (4.64 mM) and Tris-NO₃ (10 mM, pH 7.4) at 37 °C in a thermostatic bath (Neslab RTE-111). Control samples were also prepared by incubating the same proteins under the same conditions already described but in the absence of cisplatin. To remove free cisplatin, samples were filtered through a Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel-3 (3 kDa cut-off filter, Millipore) by centrifugation at 14,000 × g during 30 min, reversing the filter and recovering the retained fraction containing cisplatin-bound

proteins by centrifugation at 1000 × g for 2 min. Both fractions (retained and non-retained) were analysed by ICP-MS.

Total protein concentration in the solutions was determined by the Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The kit supplied Bradford reagent in a solution containing methanol and phosphoric acid and the standard proteins in NaCl (0.9%) and NaN₃ (0.05%). Bovine serum albumin (BSA) at seven different concentrations: 2, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 and 0.125 mg mL⁻¹ were used as standards for quantification. The 1× dye reagent was added to each standard and to the sample solutions, vortexed and incubated at room temperature for at least 5 min. The assay was performed in 2.0 mL disposable plastic cuvettes and the absorbance measured at 595 nm in an HP8453 UV-visible spectrophotometer (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany). The linear range obtained for BSA was 125–1000 μg mL⁻¹.

2.3. Stability of the platinum–protein adducts

Aliquots of 250 μL of the retained fraction on the cut-off filter for HSA incubated with cisplatin, which was prepared as described in Section 2.2, were mixed with 250 μL of the different reagents used under non-denaturing or denaturing PAGE, OFFGEL-IEF or digestion with trypsin, as shown in Table 1. After these treatments, samples were ultrafiltrated again and the retained and filtrated solutions were analysed for total Pt content determination by ICP-MS.

Firstly, it was studied if platinum–protein bonds are stable under incubation with the different chemical compounds used in PAGE,

either, in non-denaturing (Native buffer, A1 in Table 1) or in reducing and denaturing conditions (LSB containing 2% SDS together with 5% BME heated at 95 °C for 5 min, A11). As a comparison, LSB was also tested in milder conditions: non-reducing, without BME, at 25 or 95 °C (A2 and A4, respectively), reducing (with BME) at low temperatures, 25 °C (A8) or even replacing BME by 0.08 M DTT at 25 or 95 °C (A13 and A14, respectively). Incubations were made trying to emulate the time needed for the separation of proteins by SDS-PAGE (between 5 and 60 min for samples A3, A5, A9 and A12). Moreover, the influence of BME alone was also studied for longer reaction times: 5 min or 24 h (A6 and A7). Other reagents and incubation times studied were: running buffer, for 1 h (A15), Bio-Safe™ colloidal Coomassie Blue G-250 stain, for 1 h (A16) or H₂O/methanol/acetic acid (72.5/20/7.5), which is used for protein fixation to the gel prior to staining, for 1 h (A17).

On the other hand, it was also studied if the Pt bound to HSA was preserved after treatment with the reagents typically involved in OFFGEL-IEF separations. Either 2.5 M thiourea or 80 mM DTT alone was tested separately at different reaction times: 5 min and 24 h (B1, B2, B3 and B4, respectively in Table 1), as well as a denaturing solution containing 2.5 M thiourea, 80 mM DTT, 8 M urea, ampholytes and glycerol for 16 h (DS) (B5). Moreover, the effect of thiourea (B6), DTT (B7) or both DTT and thiourea (B8) in the denaturing solution was also evaluated.

Finally, in order to study the influence of the reagents used in the post-separation treatments of gels (such as enzymatic digestion and sample preparation for MS analysis), the protein bound platinum fraction (i.e. >3 kDa) was also diluted 1 + 1 with NH₄HCO₃ at different concentrations, temperatures and for different reaction times: 50 mM at 22 °C, shaking for 60 min (C1 in Table 1), 25 mM at 22 °C, shaking for 60 min (C2), 25 mM at 37 °C, shaking for 16 h (C3), Tris-HCl pH 7.8 (25 mM, 37 °C, shaking at 300 rpm for 16 h) (C4) or 5% formic acid (C5).

Total protein concentration in the solutions was also determined by the Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), as described above in Section 2.2. In all the cases studied, approximately 95% of the total protein content was recovered in the fraction higher than 3 kDa, finding no protein traces in the fraction below 3 kDa.

2.4. PAGE separation

PAGE was carried out with a Mini Protean Tetra Cell Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) using 3 and 12.5% of polyacrylamide for the stacking and the resolving gels, respectively.

For denaturing and reducing conditions, 5% (710 mM) of the reducing agent (BME) was added to the Bio-Rad's Laemmli sample buffer (LSB), containing Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), glycerol (25%), SDS (2%) and bromophenol blue (0.01%) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Samples were diluted 1 + 1 with the above mixture, and heated for 5 min at 95 °C. For SDS-PAGE separations under non-reducing conditions, samples were diluted with LSB containing the same reagents, in the absence of BME, instead. The gels were run at constant current (12 mA for 20 min and 20 mA for 3 h).

Precision Plus Protein standards, unstained (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), were used to provide a ladder of convenient and consistent molecular sizes. It contained 10 recombinant protein bands of 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 and 250 kDa. They were provided in the loading buffer (which contained glycerol (30% w/v), SDS (2%), Tris (62.5 mM, pH 6.8), DTT (50 mM), EDTA (5 mM), sodium azide (NaN₃, 0.02%) and bromophenol blue (0.01%), ready to load, with no dilution required for its application. The running buffer contained Tris-HCl (25 mM, pH 8.3), glycine (192 mM) and SDS (0.1%).

After separation, gels were washed in deionised water for 20 min and the proteins fixed on the gel for 1 h in a solution containing H₂O/methanol/acetic acid (72.5/20/7.5). Gels were visualized by staining with (a) Bio-Safe™ colloidal Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) for 1 h or (b) Dodeca Silver Stain kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

2.5. Gel mineralisation for platinum analysis by ICP-MS

Gels were cut into pieces, which were digested in mini-Teflon vessels with 1.0 mL of HNO₃ and 0.5 mL of H₂O₂ and evaporated to dryness. Two more evaporation steps were performed, adding 1.0 mL of aqua regia and then 1.0 mL of HCl. Finally, the samples were diluted to 2.0 mL with HCl 0.24 M for ICP-MS analysis.

A Quadrupole ICP-MS Thermo X-series (Thermo Electron, Windford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard nebuliser, a Fassel torch, and an Impact Bead Quartz spray chamber cooled by a Peltier system was employed for total platinum determination. ICP-MS operating conditions were: forward power, 1250 W; plasma gas, 15 L min⁻¹; auxiliary gas, 0.73 L min⁻¹; nebuliser gas, 0.85 L min⁻¹; channels per AMU, 10; and integration time, 0.6 ms. Platinum content measurements were acquired in continuous mode, monitoring *m/z* 194 (Pt), 195 (Pt), and 191 (Ir). Non-spectral interferences (matrix effects) were not observed; thus, quantification of platinum was carried out by external calibration over the working range (0.5–100 µg L⁻¹) with 20 µg L⁻¹ iridium as internal standard (IS).

2.6. OFFGEL-IEF

2.6.1. Sample preparation

About 0.250 g of kidney tissue from a rat which was treated with a monodose of 16 mg of cisplatin per m² of corporal surface and sacrificed three days after the treatment, as already described by Esteban-Fernández et al. [25], was dissected and homogenised in a Potter with 3 mL of a buffer containing Tris-HCl (10 mM), NaCl (25 mM) and 12.5 µL of a protease inhibitor cocktail. The homogenates were centrifuged at 15,000 × *g* for 40 min. All the preparative steps were performed at 4 °C to minimise the risk of species degradation or transformation. Then, protein precipitation was performed by adding six volumes of acetone (80% at –20 °C) to one volume of the cytosolic fraction (4.5 mg total protein content) to a final volume of 2.0 mL incubating the mixture overnight at –20 °C. Next, the mixture was centrifuged at 13,000 × *g* for 10 min and the supernatant was carefully removed and discarded. The pellet was then washed with a small amount of acetone, centrifuged and the supernatant was again discarded.

2.6.2. OFFGEL electrophoresis

For the pI-based protein separation, the 3100 OFFGEL Kit pH 3–10 (Agilent Technologies Inc., Waldbron, Germany) with a 12 or 24-well setup was used according to the protocol of the supplier. Ten minutes prior to sample loading, 24-cm-long IPG gel strips with a linear pH gradient ranging from 3 to 10 were rehydrated in the assembled device with 40 µL of focusing buffer (either urea 8 M, thiourea 2.5 M, DTT 0.08 M, ampholyte and glycerol, or urea 8 M, DTT 0.08 M, ampholyte and glycerol) per well. The pellet from the cytosolic fraction (4.5 mg total protein content) or the mixture of standard proteins (625 µg total protein content) was diluted with focusing buffer to a final volume of 3.6 mL, and 150 µL of sample was loaded in each well. The sample was then focused with a maximum current of 50 µA, and typical voltages ranging from 500 to 4000 V until 50 kV h was reached after 24 h. The recovered fractions (volumes between 100 and 150 µL) were diluted to 1.5 mL with distilled water for ICP-MS analysis.

2.7. In-gel tryptic digestion of proteins separated by SDS-PAGE and analysis by MALDI-TOF-MS

When protein identification was needed, *in situ* digestion with trypsin was performed after gel separation, the produced peptides were extracted and identification was obtained by peptide mass fingerprinting (PMF) following the protocols described elsewhere [8]. In brief, gel slices were washed for at least 1 h in 500 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) at 22 °C, with shaking (1000 rpm) in a Thermomixer (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany). Then, the solvent was discarded and the gel slices were washed in 500 μ L of acetonitrile/ NH_4HCO_3 (50% / 50 mM) with shaking (1000 rpm) for 1 h. Again, the wash off was discarded; each slice was cut into 2–3 pieces and transferred to a 200 μ L Eppendorf-like PCR tube. The gel slices were kept wet with the wash solution to facilitate cutting and transfer. Next, 50 μ L acetonitrile was added to shrink the gel pieces. After 10–15 min, the solvent was removed and the gel slices were dried in the Concentrator Plus (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany). Finally, the gel pieces were reswelled with 40 μ L of 50 mM NH_4HCO_3 containing 12.5 ng μL^{-1} modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA). Once the gels had been completely reswollen, 10–20 μ L of 50 mM NH_4HCO_3 was added to cover the gel pieces and incubated overnight at 37 °C.

A MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager DE-PRO, Applied Biosystems) was used to analyse protein digests. The instrumental parameters were set as follows: detector, reflectron mode; accelerating voltage, 20 kV; grid, 75%; guide wire, 0.002; delay time, 100 ns. Acquisition was made in the m/z range 800–4000. A total of 100 shots were performed per spectrum, and six spectra were accumulated per sample in order to increase the S/N ratio. Spectra were acquired in the positive ion mode.

Samples for MALDI-TOF-MS analysis were prepared following the dried droplet method. A volume of 0.5 μ L of the prepared digest was mixed with 0.5 μ L of a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid as matrix. The mixture was deposited into a stainless steel MALDI sample target and air-dried. Calibration was performed externally using the monoisotopic masses of the singly charged ions produced by the peptide standards bradikinin 1–7 (757.3997), angiotensin II (1046.5423), P14R (1533.8582) and ACTH 18–39 (2465.1989). The peaks from porcine trypsin at 841.50 and 2210.10 were used for internal mass calibration. Peptide mass fingerprinting was performed searching protein databases with either Mascot (Matrix Science, London, UK), or ProFound (Proteometrics, New York, USA) search engines. Peptide mass tolerance was set to 100 ppm, allowing two missed cleavages per peptide. Methionine oxidation was considered as variable modification. All the searches were performed without constraining proteins molecular weight (Mr) and pI, and without any taxonomic specifications. Positive identifications were considered according to the statistics of the program used, being the assignments manually checked as well.

3. Results and discussion

A systematic study on the reagents used for PAGE, for OFFGEL-IEF separation, or for post-separation treatments of gels, such as enzymatic digestion and sample preparation for MS analysis, was tackled regarding their suitability for the identification of platinum binding proteins. As a pre-screening step, incubated HSA–cisPt, chosen as a model protein, was subjected to treatment with those reagents involved in the mentioned methodologies, in order to check the degree of remaining protein-bound Pt. The preservation of Pt–protein bonds was also checked after the separation of a mixture of Pt-binding proteins by either PAGE or OFFGEL-IEF. The latter was also applied for the separation of a rat kidney extract containing Pt–proteins.

3.1. PAGE separation

3.1.1. Study of the stability of platinum–protein bonds

The stability of Pt–protein bonds after treatment with the reagents used for PAGE in non-denaturing, non-reducing, or in reducing and denaturing conditions, was studied using a HSA–Pt model, as described in Section 2.3.

Table 1A shows the percentage of Pt found in the retained and filtered fractions, calculated over the total Pt content measured in both fractions, being the protein losses, due to unspecific adsorption to the filters, around 5% for all the samples. As can be seen, sample preparation for native-PAGE, provides a high platinum content in the fraction higher than 3 kDa (94%), indicating that the platinum-bound protein was stable after the incubation in these mild conditions, avoiding buffer systems with platinophile N- or S-donor groups. However, traditional sample preparation for SDS-PAGE (A11) produced a lower recovery (64%) of platinum bound to protein, which decreased (41%) when heating for a longer period of time (60 min). Nevertheless, the recovery after heating for only 1 min was acceptable (87%). To evaluate which of the reagents used in these conditions was the origin of the platinum losses, BME alone was tested for different reaction times, 5 min and 24 h, without heating (A6 and A7, respectively). It can be seen that the recovery after 5 min of incubation was acceptable, but relatively high platinum losses were obtained for a longer reaction time (80% recovery). On the other hand, recoveries obtained under sample preparation conditions for SDS-PAGE using DTT instead of BME were very similar, either at room temperature, for 5 min: 96 (A13) vs. 91% (A8) or at 95 °C for 1 min: 87 (A10) vs. 95% (A14). Consequently, it may be concluded that the presence of a reducing agent with thiol groups (BME or DTT) at high temperatures or during long incubation times (60 min, A9 and A12) produces deleterious effects in the binding between platinum and proteins. Results also indicate that the presence of SDS at concentrations up to 1% does not affect platinum–protein bonds, even after incubation at high temperatures (A2 and A4), being the platinum recoveries in the low molecular weight fraction the lowest as compared to all the conditions studied: 2%. Moreover, Table 1A also shows that the exposure of the HSA–platinum complex for 1 h to a fixing solution and to Bio-Safe™ colloidal Coomassie Blue G-250 stain (containing less than 5% v/v phosphoric acid) resulted in a platinum loss of approximately 2% and 8%, respectively. These results demonstrate that methanol and phosphoric acid contained in the fixing solution did not significantly disrupt platinum–HSA bonds, and it is possible to stain the gel prior to MS analysis. Unsuccessful results were elsewhere reported for Fe-, Cu- and Zn-protein complexes that suffer a loss of up to 90% protein-bound metal during the staining procedure [28], indicating that the study of metalloproteins by SDS-PAGE when the metal is not covalently bound is more problematic and technically demanding.

As a result of that, it is possible to conclude that native- or SDS-PAGE in the absence of BME or DTT (A2 conditions given in Table 1A) may be appropriate to separate platinum-containing proteins. Moreover, after PAGE separation, the use of methanol/acetic acid for fixing and Colloidal Coomassie blue for staining is recommended, because these reagents do not alter the native platinum species by stripping the metal off the protein.

3.1.2. Quantification of platinum in protein bands after PAGE separation

A method was developed to follow up the separation of the Pt–protein bands after PAGE separation and for the quantification through the gel of the platinum which remained bound to the proteins. This methodology is needed for a further evaluation of the stability of platinum–protein bonds in a mixture of proteins separated by SDS-PAGE. 10 μ g of either HSA or HSA–cisPt (fraction

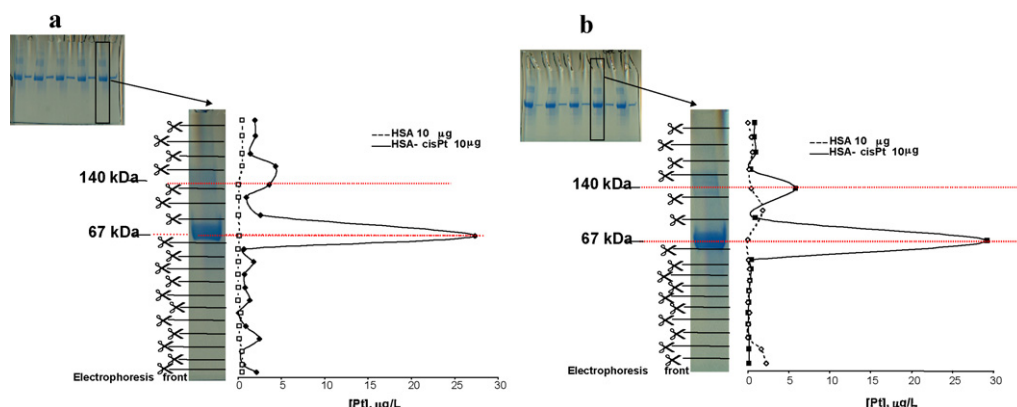


Fig. 1. Platinum profile obtained for a stained gel containing HSA or HSA-cisPt after treatment with: (a) LSB with 5% BME, or (b) LSB with 5% BME heated at 95 °C for 5 min. The stained gel was cut in 19 pieces. Left side: photo of the gel, molecular weight of standard proteins and cut areas.

higher than 3 kDa) were subjected to SDS-PAGE, using LSB with 5% BME, without heating the sample. After fixing the gel, HSA or HSA-cisPt detection was achieved using Bio-Safe™ colloidal Coomassie Blue G-250 stain. Then, several gel lanes were selected to study the distribution of platinum across their total length. Selected lanes were cut into 19 pieces, which were mineralised (see Section 2.5 for full details) and solutions obtained were diluted to 2.0 mL with HCl 0.24 M. Finally, the platinum contained in each of the gel pieces was determined by ICP-MS.

Fig. 1a shows the distribution of platinum through the 19 pieces of the gel showing the highest ICP-MS signal for platinum located on a small area corresponding to the stained area containing the protein (indicated by a red dotted line). This profile proves, first, that platinum is found in the expected band, bound to HSA, and second, that no platinum is lost during the separation since no platinum is detected at the front, where low molecular mass products are expected. Fig. 1a also shows a band containing only HSA (black dotted line), which is used as a control lane. It can be seen the total absence of platinum on the stained area as well as in the rest of the gel lane. Results confirm a reduced platinum background due to the platinum electrodes because in vertical gel electrophoresis the gel comes into very little contact with the electrodes, usually thin platinum wire. It is also important to remark that no contamination was observed due to the several steps involved in the mineralisation of the gel pieces.

Experiments were conducted to reduce the time needed for mineralisation of the gel lanes; thus, only two evaporation steps were performed, excluding the evaporation with aqua regia. Results show that although platinum distribution is the same as that with aqua regia, the response found was lower (data not shown). Therefore, for the rest of the work, mineralisation was carried out following the three evaporation steps described in Section 2.5.

The platinum data for HSA-cisPt was expressed as a percentage of the total platinum introduced in the gel lane, which is measured directly by ICP-MS, showing a recovery of 78%. This recovery is lower than the value given in Table 1 (91%), probably due to the influence of the reaction time for platinum-protein samples containing BME. However, it is important to remark the presence of most of the Pt bound to the protein even in denaturing and reducing separation conditions. This fact is very important for the analysis of platinum in biological samples where the use of these conditions may be needed.

The distribution of platinum through the gel lanes when the loaded samples, containing either 10 µg of HSA or HSA-cisPt, were previously incubated at 95 °C for 5 min with LSB containing BME was also studied. Results shown in Fig. 1b confirm the previous platinum distribution, even in the conditions in which part of the

platinum had been removed from the protein. Platinum was always absent in the lanes loaded only with HSA, as there were no traces over the blank level either in the HSA band, or in the rest of the lane. The platinum data for HSA-cisPt expressed as a percentage of the total platinum loaded in the gel lane, which was also measured directly by ICP-MS, showed a recovery of 71%. This recovery is in accordance with the values given in Table 1A (64%). Moreover, in all the lanes loaded with HSA-cisPt, a less intense upper platinum-containing band is observed. This band is due to HSA dimerisation. Results are in agreement with those reported by Ivanov et al. [29], who described, using SEC-UV, that cisplatin leads to HSA dimerisation, detecting platinum-species of around 140 kDa.

3.1.3. Evaluation of the Pt-protein bonds stability in a mixture of proteins under denaturing or denaturing and reducing PAGE

Mixtures of proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) which had been incubated separately in the absence or presence of cisPt were employed to evaluate the metal-protein bond stability under SDS-PAGE separations, using 0.3, 0.5, 1.0 and 2.0 µg of each protein. Coomassie-stained gels corresponding to the separation of the proteins by either non-reducing SDS-PAGE or reducing SDS-PAGE (using LSB with BME heated at 95 °C for 5 min) are shown in Fig. 2a and b, respectively. Moreover, Fig. 2c and d shows the platinum distribution of the selected area in Fig. 2a and b (black dotted line), respectively. As can be seen, stained proteins showed a similar protein distribution in both cases, independently on the conditions used. However, better resolution was achieved by using reducing and denaturing conditions (Fig. 2b). Estimated molecular weights of the proteins were ~76, ~67, ~29, ~17 and ~12 kDa, which were in agreement with the theoretical Mr values of TF, HSA, CA, MYO and CYT C. Moreover, it was observed that in all the lanes less intense bands appeared, corresponding to protein dimerisation (as was previously reported for HSA).

To determine the amount of platinum remaining bound to proteins under the different PAGE separation conditions, the lanes corresponding to protein bands (2 µg), which are indicated by a dotted black line, were cut in 19 pieces. The different pieces were mineralised and the platinum content was determined by ICP-MS. The platinum profiles are shown in Fig. 2c and d. As can be seen in Fig. 2a and b, the electrophoretic resolution under the described conditions allows differentiating sharp Coomassie-stained protein bands. The platinum profiles, shown in Fig. 2c and d, for these gels, seem to have less resolution, but this is an artifact as for these measurements, lanes were not cut in tiny bands; the goal was only to show that the platinum was still bound to protein bands and only to these bands. In all the cases, a big peak can be discerned, at a mass around 150 kDa, which corresponds to the TF and HSA

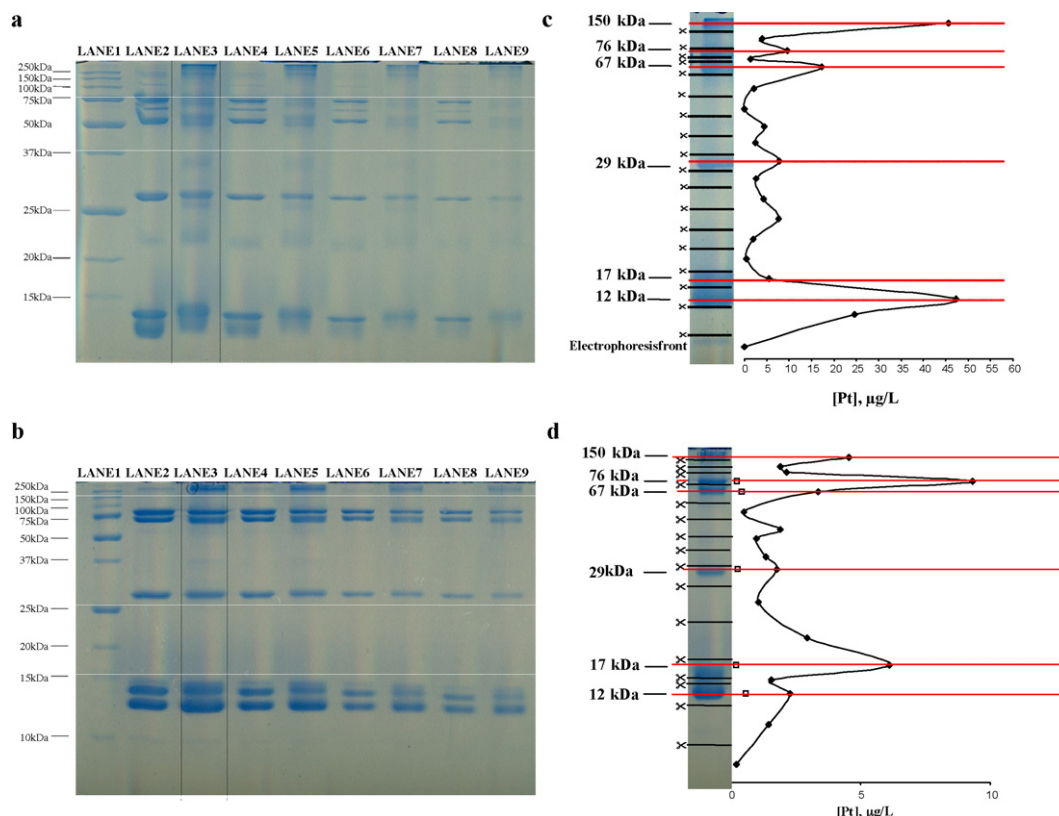


Fig. 2. Separation of a mixture of standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) under different PAGE conditions: (a) denaturing and (b) denaturing and reducing. (c and d) The platinum distribution of the selected area in (a) and (b), respectively. (d) White squares, which correspond to the platinum content found in the gel loaded with the same mixture of proteins, but without cisplatin. Left side of (a), (b): molecular weight of standard proteins. In (a) and (b), Lane 1: Precision Plus Protein standards; Lanes 2, 4, 6 and 8: differing amounts (2, 1, 0.5 and 0.3 µg, respectively) of mixed standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C); Lanes 3, 5, 7 and 9: differing amounts (2, 1, 0.5 and 0.3 µg, respectively) of mixed standard platinum–proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C).

dimerisation. Two other high peaks are observed at around 76 and 67 kDa, corresponding to TF and HSA, respectively. Furthermore, proteins below 37 kDa (CA), around 20 kDa (MYO) and higher than 15 kDa (CYT C) also contain a fairly high amount of platinum. It is also important to remark the high amount of platinum in the stained bands of the gel. Recovery value for platinum was of 110% for non-reducing SDS-PAGE (Fig. 2c), which confirms the preservation of the platinum–protein bond. However, a lower platinum recovery, 25% (Fig. 2d), was found for traditional reducing SDS-PAGE conditions, due to the high influence of BME and temperature in platinum–protein bonds.

Therefore, it is concluded that SDS-PAGE should be performed under non-reducing conditions in order to preserve Pt–protein bonds during the separation of mixtures of Pt–proteins.

3.1.4. Detection limits

Different amounts of platinum–proteins covering the range 0.3–2.0 µg (for single proteins) were also mineralised, showing the platinum quantification, by ICP-MS, a good linearity ($r=0.951$ for TF, $r=0.992$ for HSA, $r=0.996$ for CA, $r=0.998$ for MIO and $r=0.998$ for CYT C) for all the platinum–proteins studied. Furthermore, the background recorded for all proteins is quite similar, indicating that the gel analysed could be considered as platinum-free. The limits of detection (based on 3 times the standard deviation of 6 blanks measured from one gel for the denaturing PAGE using LSB separation) were 10.1 pg for TF–cisPt, 10.3 pg for HSA–cisPt, 13.9 pg for CA–cisPt, 2.4 pg for MYO–cisPt and 4.7 pg for CYT C–cisPt. These limits of detection are satisfactory for their application to biological samples.

3.2. Separation by OFFGEL-IEF

3.2.1. Study of the effect of the reagents used for OFFGEL-IEF separations on the stability of platinum–protein bonds

In the pre-screening step it was also studied if the complex HSA–cisPt retained the platinum after treatment with the reagents typically used during OFFGEL-IEF, most often involving denaturing and reducing solutions containing urea, thiourea and DTT, as described in Section 2.3. Results are shown in Table 1B, which are also given as the percentage of platinum found in each fraction with respect to the total content in the sample. It can be seen that thiourea (Table 1, B1, B2) or denaturing solutions containing thiourea (Table 1, B5) led to the loss of a high percentage of the platinum bound to the protein (losses of about 40%) independently on the reaction time employed (5 min or 24 h). This is due to the strong reactivity of platinum compounds toward S-donor molecules and the formation of very stable Pt^{II} –S bonds, which results in a competition between thiourea and the protein for platinum. A similar competition was reported between intracellular thiols and DNA, resulting in a resistance to antitumor platinum drugs [2,3].

However, the platinum protein bond resisted the action of 8 M urea, buffer ampholytes and glycerol (Table 1, B8, 98% Pt recovery), and also tolerated the DTT concentrations used for OFFGEL-IEF (B4, 85% Pt recovery). Even the treatment with a combination of the previously mentioned reagents in denaturing solutions containing DTT provided acceptable recoveries (B7, 79% Pt recovery), as long as they did not contain thiourea. The significant strength of the platinum–protein bonds was already demonstrated by Moreno-Gordaliza et al. [24].

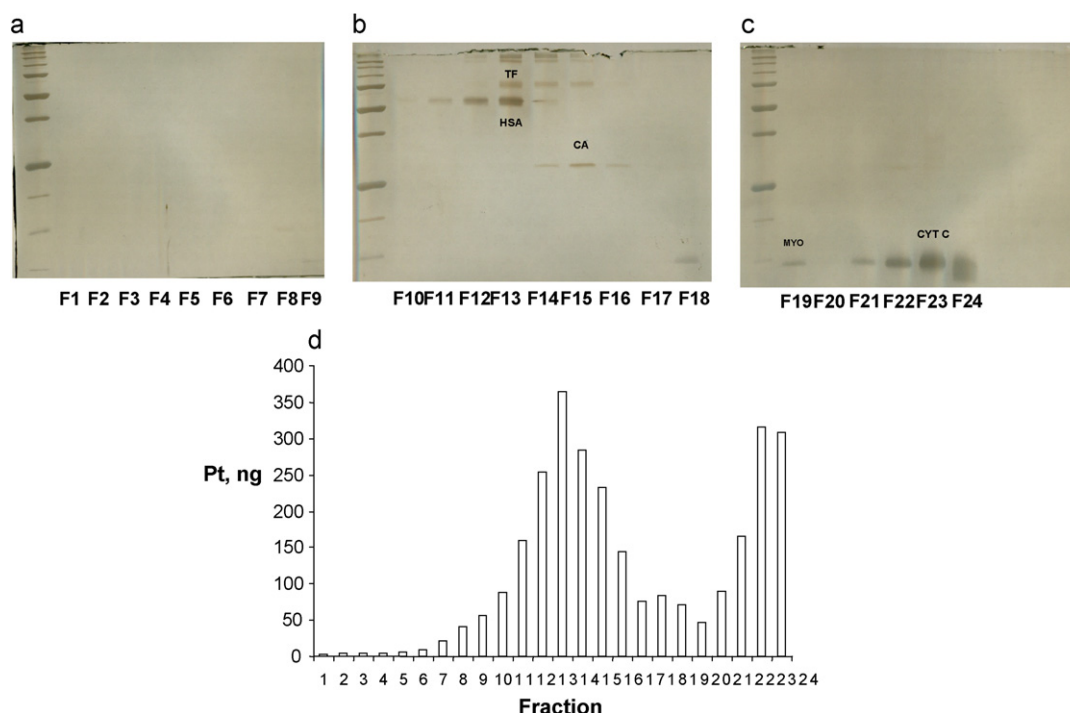


Fig. 3. Non-reducing SDS-PAGE of OFFGEL-IEF liquid fractions (24 fractions using strips with a pH range between 3 and 10) obtained under denaturing and non-reducing conditions in the absence of thiourea for the separation of a mixture of standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) incubated with cisplatin: (a) fractions 1–9, (b) fractions 10–18 and (c) fractions 19–24. In all figures lane 1 corresponds to Precision Plus Protein standards; (d) platinum profile obtained in the OFFGEL-IEF fractions described above with ICP-MS analysis. Gels were visualised by staining with Dodeca Silver Stain kit.

From the above results, it can be concluded that the use of thiourea has to be avoided for sample solubilisation of proteins containing platinum. Although it has been reported that the use of thiourea in addition to urea improves solubilisation, particularly of membrane proteins [30], for the separation of platinum–proteins by IEF, a denaturing solution without thiourea is recommended, being the presence or absence of DTT not so important.

3.2.2. Evaluation of the Pt–protein bonds stability in a mixture of proteins under OFFGEL-IEF separation conditions

A mixture of standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) incubated with cisplatin was also used to investigate the OFFGEL-IEF separation under denaturing and non-reducing conditions (without DTT) in the absence of thiourea. Protein separation takes place in a two-phase system with an upper liquid phase that is divided in compartments and a lower phase that is a conventional rehydrated IPG strip. Typically, the sample is diluted in the focusing buffer and loaded into all wells. Because there is no fluidic connection between the wells, proteins are forced to migrate through the IPG gel where the actual separation takes place. After IEF, the proteins are present in the liquid phase and can be recovered conveniently from the wells for further processing. Proteins were separated in 24 fractions, using strips with a pH range between 3.00 and 10.00. Then, proteins were identified in their respective IEF fractions visualising the proteins after a consecutive separation of the different fractions by non-reducing SDS PAGE, which is shown in Fig. 3a–c.

As can be seen, the procedure separated the proteins mainly in the following fractions (the data in brackets correspond to the expected pH ranges per fraction given by the supplier): TF (~76 kDa) in fraction F13 (6.50–6.76), F14 (6.76–7.03) and F15 (7.03–7.29); HSA (~67 kDa) in fraction F11 (5.98–6.24), F12 (6.24–6.50), F13 (6.50–6.76) and F14 (6.76–7.03); CA (~29 kDa) in fraction F14 (6.76–7.03), F15 (7.03–7.29) and F16 (7.29–7.55);

MYO (~17 kDa) in fraction F18 (7.81–8.08) and F19 (8.08–8.34); and CYT C (~12 kDa) in fraction F21 (8.60–8.86), F22 (8.86–9.13), F23 (9.13–9.29) and F24 (9.39–9.65). It can be concluded that these results are consistent with their theoretical pI values (6.8, 5.9, 6.4, 7.2, and 9.6 for TF, HSA, CA, MYO and CYT C, respectively). It should be noted that experimental pI values for Pt–proteins are displaced with respect to pI values obtained in a parallel experiment for proteins without cisplatin (data not shown). Moreover, Fig. 3b also shows the presence of protein dimers in the different fractions mentioned above. In addition, to evaluate the applicability of the separation protocol for platinum–protein analysis, platinum determination is needed to correlate with the presence of proteins in the fractions produced following separation by IEF. This determination was performed by ICP-MS. Fig. 3d showed the migration patterns for the mixed platinum–proteins. It can be seen that high amounts of platinum were obtained for the different fractions containing the different proteins, which indicates the preservation of the platinum–protein bond and the absence of free platinum. A recovery value of 60% was obtained for platinum.

As has been observed, proteins treated with cisplatin show important changes in their electrophoretic behavior, as they may, either dimerise or react with diverse amounts of Pt atoms with different possible ligands remaining coordinated to them, which can affect the separation by SDS-PAGE and IEF, respectively. So, separation methodologies for these samples present added difficulties. Nevertheless, in real samples, Pt-bound proteins present a lower degree of heterogeneity, due to lower Pt concentrations present in biological samples after cisplatin treatment. The OFFGEL separation method described in this work is usable when coupled to gel electrophoresis and in gel digestion of the separated bands for further peptide identification by LC-MS/MS. But most importantly, along all these procedures, it is imperative to keep platinum attached to the proteins, as was achieved and demonstrated by the previous experiments.

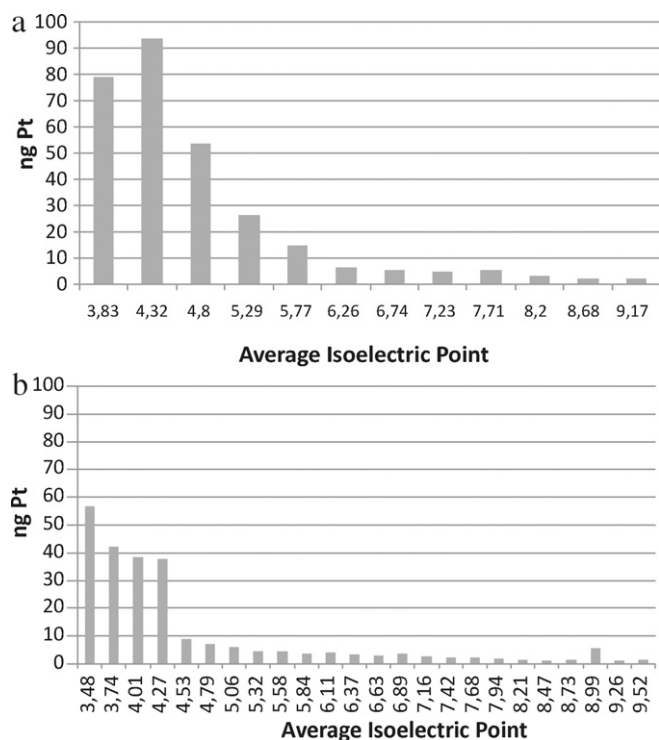


Fig. 4. Platinum profile obtained by ICP-MS analysis for the OFFGEL-IEF liquid fractions under: (a) well-established denaturing conditions (urea, thiourea, ampholytes, DTT and glycerol) (12 fractions using strips with a pH range between 3 and 10), or (b) with denaturing conditions without using thiourea or DTT (24 fractions using strips with a pH range between 3 and 10) for the separation of kidney tissue extracts containing platinum.

3.2.3. Evaluation of the stability of Pt-protein bonds in a rat kidney tissue extract under OFFGEL-IEF separation conditions

Kidney cytosols from rats treated with cis-Pt were isoelectrically fractionated in the conditions previously described, as an alternative to the classical IEF, which is performed in the presence of thiourea, for the separation of platinum binding proteins. Prior to the separation it was necessary to precipitate the proteins present in the cytosolic fraction (following the procedure described in Section 2.6.1) due to the incompatibility of the cytosolic extraction solution with the OFFGEL-IEF system. The cytosolic proteins were separated by OFFGEL-IEF under denaturing conditions (B5, in Table 1), which showed a complete solubilisation of the proteins. Proteins were separated in 12 fractions, using strips with a pH range between 3 and 10. Moreover, for comparison purposes the same tissue extracts were separated under denaturing conditions without thiourea and DTT (Table 1, B8), which showed a solubilisation of approximately 60% of the proteins. Proteins were separated in 24 fractions, using strips with a pH range between 3 and 10.

The results on the platinum determination, which was performed by ICP-MS analysis, in the different fractions produced following separation by OFFGEL-IEF, are shown in Fig. 4. A similar platinum distribution under both conditions can be seen, and a high amount of platinum was obtained mainly for the first four fractions. However, each fraction was subjected to ultrafiltration in order to measure the platinum remaining bound to the proteins. Recoveries of 23% (Fig. 4a) and 85% (Fig. 4b) for platinum bound to the proteins, were obtained after separation under denaturing and reducing conditions or denaturing conditions without DTT and thiourea, respectively. These results indicate the suitability of the OFFGEL-IEF in the absence of thiourea and DTT to separate and maintain the integrity of platinum-protein complexes.

3.3. Sample treatments for the analysis of platinum containing proteins by mass spectrometry

Structural identification of platinum binding proteins in the separated electrophoretic bands requires performing an enzymatic digestion followed by MALDI-TOF-MS or ESI-MS analysis. Thus, the stability of platinum containing proteins to some of the reagents used along an in-gel tryptic digestion and extraction procedures was also evaluated.

The influence of NH_4HCO_3 was investigated because this reagent is employed during the in-gel tryptic digestion of proteins. Overnight digestion in a Tris-HCl buffer was also included as control due to the stability under these conditions of platinum-proteins complexes already reported by Moreno-Gordaliza et al. [24]. The Pt-bound HSA fraction (i.e. >3 kDa) was also diluted 1 + 1 with NH_4HCO_3 at different concentrations, temperatures and for different reaction times, as described in Section 2.3.

As shown in Table 1C the recovery of protein bound platinum was high for these samples, between 93 and 99%, showing the suitability of all the conditions studied for tryptic digestion of platinum-proteins. Moreover, a high recovery value (98%, Table 1, C5) was also obtained in the presence of formic acid for 1 h, indicating the suitability of this reagent, widely used for ESI-MS analysis. These results may indicate that platinum-containing proteins may be able to resist the effect of the reagents tested, which are used along a classical proteomic in-gel digestion with trypsin.

3.3.1. Identification of proteins by MALDI-TOF-MS

Studies have been conducted to confirm that the Pt-protein bands, appearing at higher molecular weights in SDS-PAGE were, positively, the dimers of the treated proteins. Identification of those intense proteins bands in the gel following the SDS-PAGE separation under non-reducing conditions of the solution containing the five cisplatin-proteins complexes, running at approximately 160, 140, 60, 35 and 24 kDa, was carried out by MALDI-TOF-MS, following spot excision and tryptic *in-gel* digestion. Peptide mass fingerprinting was performed searching protein databases with either Mascot or Profound search engines. It can be concluded that TF, HSA, CA, MYO and CYT C are clearly present in the selected bands by peptide matching, which indicates protein dimerisation. Moreover, as expected, TF, HSA, CA, MYO and CYT C are also present in their corresponding bands (76, 67, 29, 17 and 12 kDa, respectively) by peptide matching. The presence of heterogeneity in proteins treated with cisplatin has been previously observed by our group (unpublished results), and are due to both, dimerisation and platinum-catalyzed specific protein fragmentation. However, only no metal-containing peptides could be found in the peptide maps and future studies will focus on the identification of the platinum binding sites and platinum-containing peptides using ESI coupled to tandem mass spectrometry.

4. Conclusions

The suitability of a 2D electrophoretic separation procedure able to preserve platinum-protein bonds has been demonstrated. This method is based on the use of sequential OFFGEL-IEF and PAGE. Furthermore, general parameters for post-separation treatments to make the proteins suitable for further structural MS analysis, preserving the platinum-protein bonds along the whole analytical procedure, have been settled. The main reason for the loss of protein-bound platinum during the separation lies on the use of some reagents, such as BME, DTT or thiourea. Therefore, the use of SDS-PAGE in the absence of BME or DTT is recommended. However, neither the influence of the electric field during electrophoresis

separation, nor the processes of fixing, staining and destaining proteins in the gel seemed to result in the loss of platinum from platinum binding proteins. The suitability of the separation of platinum binding proteins from a kidney tissue extract by OFFGEL-IEF was demonstrated.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Spanish CICYT project CTQ-2008-04873.

References

- [1] R.F. Ozols, *Cancer Treat. Rev.* 10 (1993) 188.
- [2] J.K.C. Lau, D.V. Deubel, *Chem. Eur. J.* 11 (2005) 2849.
- [3] M.S. Robillard, J. Reedijk, in: R.B. King (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2005, p. 4488.
- [4] Z.H. Siddik, M. Jones, F.E. Boxall, K.R. Harrap, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 21 (1998) 19.
- [5] K. Heydorn, B. Rietz, A.J. Krarup-Hansen, *J. Trace Elem. Exp. Med.* 11 (1998) 37.
- [6] O. Carrette, P.R. Burkhard, J.C. Sanchez, D. Hochstrasser, *Nat. Protoc.* 2 (2006) 812.
- [7] P.H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4007.
- [8] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850.
- [9] C.C. Chery, L. Moens, R. Cornelis, F. Vanhaecke, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 91.
- [10] J.S. Becker, M. Zoriy, C. Pickhardt, M. Przybylski, J.S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.* 242 (2005) 135.
- [11] A. Polatajko, M. Azzolini, I. Feldmann, T. Stuezel, N. Jakubowski, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 878.
- [12] M.G. Añorbe, J. Messerschmidt, I. Feldmann, N. Jakubowski, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 917.
- [13] M.S. Jiménez, M.T. Gomez, L. Rodriguez, L. Martinez, J.R. Castillo, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 699.
- [14] B.J. Cargile, D.L. Talley, J.L. Stephenson Jr., *Electrophoresis* 25 (2004) 936.
- [15] P.G. Righetti, A. Castagna, P. Antonoli, E. Boschetti, *Electrophoresis* 26 (2005) 297.
- [16] P.E. Michel, F. Reymond, I.L. Arnaud, J. Josserand, H.H. Girault, J.S. Rossier, *Electrophoresis* 24 (2003) 3.
- [17] P. Hörth, C.A. Miller, T. Preckel, C. Wenz, *Mol. Cell. Proteom.* 5 (2006) 1968.
- [18] T.Q. Shang, J.M. Ginter, M.V. Johnston, B.S. Larsen, C.N. McEwen, *Electrophoresis* 24 (2003) 2359.
- [19] B. Pioselli, C. Munro, A. Raab, C.L. Deitrich, K. Songsrirote, J. Feldmann, J. Thomas-Oates, *Metallomics* 1 (2009) 501.
- [20] D. Esteban-Fernández, E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, *Metallomics* 2 (2010) 19.
- [21] S. Lustig, J. De Kimpe, R. Cornelis, P. Schramel, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 484.
- [22] S. Lustig, D. Lampaert, K. De Cremer, J. De Kimpe, R. Cornelis, P. Schramel, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 1375.
- [23] R. Ma, C.W. McLeod, K. Tomlinson, R.K. Poole, *Electrophoresis* 25 (2004) 2469.
- [24] E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, *Analyst* 135 (2010) 1288.
- [25] D. Esteban-Fernández, J.M. Verdaguer, R. Ramírez-Camacho, M.A. Palacios, M.M. Gómez, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 140.
- [26] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, F.R. Abou-Shakra, H. Birtwistle, J. Coffey, *Chem. Commun.* 2708 (2001).
- [27] Y. Gao, C. Chen, P. Zhang, Z. Chai, W. He, Y. Huang, *Anal. Chim. Acta* 485 (2003) 131.
- [28] A. Raab, B. Pioselli, C. Munro, J. Thomas-Oates, J. Feldmann, *Electrophoresis* 30 (2009) 303.
- [29] A.I. Ivanov, J. Christodoulou, J.A. Parkinson, K.J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P.J. Sadler, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14721.
- [30] T. Rabilloud, *Electrophoresis* 19 (1998) 758.

Trabajo 5

“Characterization of Pt-protein complexes by nHPLC-ESI-LTQ MS/MS using a gel-based bottom-up approach”

Talanta (2012), 88, 599-608

Este trabajo fue presentado como Comunicación en formato Póster en el “Proteomic Forum” celebrado en Berlín (Alemania) en Abril de 2011



Characterization of Pt-protein complexes by nHPLC–ESI–LTQ MS/MS using a gel-based bottom-up approach

Estefanía Moreno-Gordaliza, Benito Cañas, María A. Palacios, M. Milagros Gómez-Gómez*

Department of Analytical Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2011

Received in revised form 31 October 2011

Accepted 11 November 2011

Available online 19 November 2011

Keywords:

Cisplatin

Proteins

Binding-sites

SDS–PAGE

In-gel digestion

HPLC–MS/MS

ABSTRACT

The suitability of in-gel digestion for the characterization of Pt-binding proteins by gel-based bottom-up MS approaches has been evaluated regarding the preservation of Pt-protein bonds during the process. Standard proteins (albumin, transferrin, carbonic anhydrase, myoglobin and cytochrome c) incubated with cisplatin were separated by nHPLC–ESI–LTQ–MS/MS and Pt-peptides were recognized in all the proteins studied on the basis of their isotopic pattern. Only when the reducing and alkylating reagents were used, the amount of detectable Pt-peptides decreased due to the high reactivity of thiol containing reagents towards Pt. Furthermore, the repeated use of acetonitrile could lead to the replacement of ligands originally attached to Pt by CN^- , but does not affect the Pt-protein binding. Platinum-binding sites on the proteins were elucidated from the CID–MS/MS fragmentation spectra and assessed by evaluation of protein structures. Several histidines, cysteines and methionines were identified as platinum binding sites in the different standard proteins. Results were in accordance to those obtained with in-solution digestions.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of platinum drugs as anticancer agents has been essential for the treatment of numerous solid tumors for the last decades and nowadays they are still employed in more than half of the treatments, usually in combination with other drugs. Their antitumor activity can be ascribed to their ability to form adducts with DNA bases, in which distortion of the double helix is implied, resulting in apoptosis of tumor cells [1]. However, the whole cytotoxic mechanism may be more complex and is still uncertain. In fact, the capacity of Pt drugs to coordinate to other biomolecules containing nucleophilic groups, such as proteins, has also been long-known and should be born in mind in order to understand their activity, as this can influence the transport, uptake, excretion and availability of the drug [2]. Moreover, the interactions with proteins have often been related to the severe side-effects (nephrotoxicity, ototoxicity, myelosuppression) and the occasional acquired or inherent resistance observed during treatments with Pt drugs. The great importance of this issue makes it essential to develop analytical methodologies for the identification of Pt-binding proteins in biological samples, in order to shed some light on the mechanism of Pt-drugs toxicity.

The suitability of soft ionization-based mass spectrometric techniques for the characterization of Pt-binding proteins has been reported before, mainly in numerous studies of standard proteins incubated with Pt drugs (transferrin [3], metallothioneins [4], cytochrome c [5], ubiquitin [6], myoglobin [7], superoxide dismutase [8], insulin [9]). In particular, electrospray ionization (ESI) has turned out to be more appropriate than matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) for the characterization of Pt-proteins in terms of preservation of the metal and the original ligands attached to it [9,10]. On the other hand, the proteomics bottom-up approach, using CID MS^n fragmentation on peptide ions from digested proteins seems to be more informative regarding the localization of Pt-binding sites in proteins than the top-down approach on intact Pt-protein complexes [11], although the latter involves a lower degree of sample treatment and a lower risk of alteration of the original adducts in a sample.

A great challenge when facing the study of metal-binding proteins in biological samples is to deal with the separation of very complex mixtures of proteins using multidimensional separation methods, followed by the use of analytical techniques that may allow detecting and identifying metal-proteins (or metal-peptides when enzymatic digestions are applied). The critical issue is that the metal-protein (in this case, Pt-proteins) bond should be preserved along all the steps involved in the methodology.

The use of chromatography for the separation of proteins may be problematic in terms of recoveries of the sample, especially

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 51 46; fax: +34 91 394 43 29.

E-mail address: mmgomez@quim.ucm.es (M.M. Gómez-Gómez).

when dealing with reverse phase chromatography, which is also required for enhancing the resolution of the separation. Nevertheless, a bottom-up shotgun approach can be applied, as the resolution achieved by chromatographic separations at peptide level is considerably higher than when dealing with proteins. In fact, multidimensional protein identification technology (MudPIT) on-line coupled to ESI-MS/MS was used for the identification of platinated peptides from serum samples and *E. coli* extracts incubated with cisplatin [12,13].

Another very appealing possibility is to carry out a bottom-up approach by first separating proteins by 2-D electrophoresis (2-DE), usually applying isoelectric focusing followed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), which allows the separation of thousands of proteins [14]. In this case, the highly sensitive elemental technique laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) has been proposed as a very interesting tool for the direct detection of metals in the protein spots by analysis of the gels after the protein separation [15]. Then, the protein spots in which the metal has been detected can be excised and in-gel digested, followed by nHPLC-ESI-MS/MS analysis, which represents additional separation dimensions. Their identification is possible by searching the results by algorithmic comparison against a protein database, for example by using SEQUEST or MASCOT, where the metal moiety mass is included as a variable modification in the search. Again, the preservation of the metal-protein bond along all the steps involved in the analysis is crucial. For this reason, especially for non-covalent bound metals like Zn, Cu or Fe, the use of non-denaturing and non-reducing conditions during the electrophoretic separations has been proposed [16]. In the case of Pt-protein complexes, denaturing conditions may still be appropriate for their separation but, in general, the use of sulfur containing reagents such as thiourea has been shown to be problematic, as is the case of reducing agents as dithiotreitol (DTT) or β -mercaptoethanol (BME) [17].

There are only few precedents on the use of gel electrophoresis for the separation of Pt-binding proteins, detection of Pt in the gels by LA-ICP-MS and in-gel digestion, followed by HPLC-ESI-MS/MS for their identification. In particular, the methodology was applied on proteins from either *E. Coli* cell extracts [18] or blood serum [19], both incubated with cisplatin, allowing the identification of OmpA [18] or albumin, transferrin and α -2-macroglobulin [19], respectively, in the observed Pt bands or spots. However, in those cases, no Pt-peptides were detected. On the other hand, few works report the identification of other metalloid-containing peptides after in-gel digestion of proteins: Se-peptides from two proteins, SIP 18 and HSP 12, were detected in a Se-enriched yeast sample, by nHPLC-ESI-MS/MS [20]; additionally, a Zn-containing peptide in albumin, on the basis of the mass observed in the analysis by MALDI-TOF MS of the in-gel digest, was assigned [21]. In contrast, in some other works where Zn, Cu or Fe-proteins were studied, the lack of metal-binding peptides in the mass spectra after in-gel digestion was reported [22].

Therefore, it seems essential to examine if the gel-based bottom-up methodology, and particularly the reagents involved along the in-gel digestion process, are suitable for the characterization of Pt-binding proteins. With this purpose, several model proteins were incubated with cisplatin and separated by SDS-PAGE to evaluate the suitability of the conventional in-gel digestion protocol for the detection of Pt-peptides and the identification of Pt-binding sites by subsequent nHPLC-ESI-MS/MS analysis of the digests. The model proteins selected, all of them reactive towards cisplatin [17], have different complexities to be taken into account during the study: equine cytochrome c (CYT C), equine myoglobin (MYO) and bovine carbonic anhydrase (CA) present a relatively small size (12, 17 and 29 kDa, respectively) and lack disulfide bonds. Conversely, human

serum albumin (HSA) and human transferrin (TF) are larger (67 and 79 kDa, respectively) and present numerous disulfide bonds.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Cisplatin ($\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$) and standard proteins (apo-transferrin from human serum, TF; human serum albumin, HSA; carbonic anhydrase from bovine erythrocytes, CA; myoglobin from horse heart, MYO; and cytochrome c from horse heart, CYT C) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium chloride (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain) and Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (Fluka) were used for the preparation of the incubation solution under physiological conditions. High purity nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany) was used for the pH adjustment of the mentioned incubation solution. A pH-meter (Crison) or pH indicator strips (pH 6.5–10, special indicator, Merck, Darmstadt, Germany) were used in order to control the pH of the solutions prepared. Solutions were prepared with deionized water (Milli-Q Ultrapure water systems, Millipore, USA) except the ones involved during tryptic digestions and further analysis, in which mass spectrometry (MS) grade water from Scharlab (Barcelona, Spain) was used. MS grade acetonitrile (ACN) was also obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3), trifluoroacetic acid (TFA), formic acid (FA), urea, dithiothreitol (DTT) and iodoacetamide (IAA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Porcine trypsin gold mass spectrometry grade was obtained from Promega (Madison, WI, USA).

2.2. Incubation of standard proteins with cisplatin

To produce Pt-protein adducts, standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C (60 μM)) were incubated separately with cisplatin (600 μM) at a molar ratio 1:10 in a buffer containing NaCl (4.64 mM) and Tris-NO_3 (10 mM, pH 7.4), reproducing the physiological intracellular saline and pH conditions, at 37 °C in a thermostatic bath (Neslab RTE-111), for 96 h. Control samples were also prepared by incubating these same proteins under the conditions described but in the absence of cisplatin. Unbound cisplatin was removed after the incubations with 3 kDa spin-cut-off filters (Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel-3, Millipore, USA) by centrifugation at $14,000 \times g$ for 30 min, followed by a further washing step of the retained protein fraction with the incubation buffer.

2.3. SDS-PAGE

Pt-bound proteins were diluted appropriately and mixed 1 + 1 with Laemmli sample buffer (LSB), containing: Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), glycerol (25%), SDS (2%) and bromophenol blue (0.01%) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The mixtures were heated for 1 min at 95 °C for denaturing the proteins.

The non-reducing SDS-PAGE separations were carried out in a Mini Protean Tetra Cell Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) using 3% and 12.5% of polyacrylamide for the stacking and the resolving gels, respectively. 2 μg of each protein were loaded on the gels, which were run at constant current (12 mA for 20 min and 20 mA for 3 h). The running buffer contained Tris-HCl (25 mM, pH 8.3), glycine (192 mM) and SDS (0.1%). Precision Plus Protein unstained standards (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), were also loaded on the gels as molecular weight markers.

After electrophoresis, proteins were fixed on the gel with a solution containing 40% methanol and 10% acetic acid for 30 min. Gels were visualized by staining with Bio-Safe Colloidal Coomassie Blue

G-250 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) for 1 h, and finally washed with water for 1 h.

2.4. In-gel digestions

Protein bands were excised from the gels with a scalpel, transferred to 600 μL siliconized Lo-bind Eppendorf tubes and washed for 30 min in 150 μL of 25 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) at 22 °C, shaking at 1000 rpm in a Thermomixer (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany). Washing solutions were always discarded onwards. The gel slices were unstained in 150 μL of 50% acetonitrile in 25 mM NH_4HCO_3 shaking at 1000 rpm for 30 min, this step being repeated as many times as needed. When completely unstained, the gel slices were washed with 25 mM NH_4HCO_3 for 15 min to keep them completely hydrated during the following step. Then, the gel slices were cut into 1 mm \times 1 mm pieces and 50 μL of acetonitrile were added to shrink the gel plugs. After 10 min, the solvent was removed and the gel pieces were dried in a vacuum centrifuge, Concentrator Plus (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany).

Whenever reduction and alkylation were performed, gel pieces were reswollen and incubated with 40–50 μL of 10 mM DTT at 37 °C for 40 min. After that, the solution was discarded and replaced by 40 μL of 55 mM IAA, followed by incubation at room temperature in the darkness for 40 min. Then, gel pieces were washed with 100 μL of 25 mM NH_4HCO_3 for 15 min and dehydrated with 50 μL of ACN. Afterwards, gel pieces were dried in a vacuum centrifuge.

The dry gel pieces were rehydrated in an ice bath with 12.5 ng μL^{-1} trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 (typically 20 μL). Once the gels had been completely reswollen, 10–20 μL of 25 mM NH_4HCO_3 were added to cover the gel pieces and then incubated at 37 °C for 16 h. After digestion, supernatants were collected and transferred to eppendorf tubes, and kept at 4 °C. Peptides remaining in the gels were extracted with 40 μL of 2% HCOOH, with vortexing, and incubation for 30 min at room temperature. Extracted peptides were pooled with the original supernatants. Additionally, 40 μL of a solution containing 50% ACN, 0.1% HCOOH were added to the gel plugs, vortexed and incubated for another 30 min. The extraction solution was pooled with the previous ones and samples were evaporated in a vacuum centrifuge until near dryness. For nHPLC–MS/MS analysis, digests were diluted with a solution containing 2% ACN, 0.1% HCOOH to a final volume of 15 μL .

2.5. In-solution digestions

The generated Pt-bound standard proteins were also digested in-solution. 100 μg of each protein were digested with porcine trypsin (1:30 w/w trypsin:protein ratio) in a buffer containing 50 mM Tris– NO_3 (pH 7.8) and 1 M urea, at 37 °C for 16 h. The digestions were performed in a thermomixer, shaking at 300 rpm. When dealing with disulfide-containing proteins, reducing and alkylating steps were also alternatively included in the protocol, using 10 mM DTT and 50 mM IAA, as described elsewhere [11]. Prior to the nHPLC–MS analysis, digests were desalted by micro-solid phase extraction, using Omix tips (C_{18} , 10 μL , Agilent Technologies), the samples being eluted in 70% ACN, 0.1% HCOOH and finally diluted at least 1:10 with 2% ACN, 0.1% HCOOH.

2.6. NanoHPLC–ESI-LTQ MS/MS

ESI-MS/MS data were acquired using a linear ion trap LTQ XL with ETD (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nano-electrospray source from Proxeon (Odense, Denmark). Instrumental parameters were tuned with a solution of 2 μM human [Glu¹]-Fibrinopeptide B (Sigma–Aldrich), prepared in 70% ACN, 0.1% HCOOH. During the analysis, the parameters were

typically set to: capillary temperature: 200 °C, capillary voltage: 30 V, tube lens: 105 V. A triple play scan method was employed, consisting on acquisition of full enhanced MS scans in the positive ion mode, over the m/z range 400–1600, followed by zoom scans and further full enhanced MS/MS, acquired in profile mode, of the three most intense peaks in the full MS scan. CID was used for the fragmentation of ions in MS/MS experiments. Typically, the conditions applied during the CID experiments were: 35% relative collision energy, activation time of 30 ms, and isolation width of the precursor ions was set to 4. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1, using a 180 s exclusion duration window.

A dual-gradient system nanoHPLC pump (nanoLC ultra 1D Plus, Eksigent) with a Thermo Electron Micro AS autosampler was used. Aliquots of samples (5 μL) were injected, using a 20 μL loop and a pick-up method, and loaded on a trap column (Reprosil pur C_{18} , 3 μm particle size, 0.3 mm \times 10 mm, 120 Å pore size, SGE) at a 3 $\mu\text{L min}^{-1}$ flow rate using 2% ACN, 0.1% HCOOH as mobile phase. The preconcentrated peptides were eluted and transferred to a reverse phase microcapillary analytical column (Acclaim PepMap 100, C_{18} , 3 μm particle size, 75 $\mu\text{m} \times$ 15 cm, 100 Å pore size, Dionex, LC Packings) by reversing the flow at 200 nL min^{-1} . Peptide elution was performed applying a three-step gradient: 5–15% B linear for 5 min, 15–40% B linear for 40 min and 40–80% B linear for another 5 min, holding the system at 80% B for 10 min. Mobile phases used were: A, 2% ACN, 0.1% HCOOH; and B, 99.9% ACN, 0.1% HCOOH. The end of the column was connected to a stainless steel nano-bore emitter (O.D. 150 μm , I.D. 30 μm , Proxeon, Odense, Denmark) for spraying and coupling with the LTQ. The spray voltage was set at 1.70 kV.

For data analysis, spectra were assessed with Xcalibur Qual Browser software (Thermo Electron). Search on human, equine and bovine Uniprot KB protein databases using SEQUEST allowed the confirmation of the identity of proteins. Platinum peptides were recognized and identified taking into account the isotopic patterns both in the zoom scans of the precursor ions and in the MS/MS spectra.

3. Results and discussion

A number of platinated standard proteins (TF, HSA, CA, MYO, CYT C) were subjected to SDS-PAGE separation in a set of conditions that were previously reported to be the most appropriate for the preservation of platinum-protein bonds [17], in essence, in the absence of thiol-containing reducing agents. The bands containing these Pt-proteins were in-gel digested and analyzed by nHPLC–ESI-MS/MS, in order to determine if the steps and reagents involved in this particular type of digestion procedure may be compatible with the preservation of Pt-protein bonds, and thus appropriate for the study and characterization of Pt-binding proteins. The effect of reduction and alkylation steps during the in-gel digestions on the yield of Pt-peptides was also evaluated. Additionally, for comparison purposes, in-solution digestions were performed on the same protein models. Platinum binding sites were determined in the proteins by using the gel-based bottom-up approach. The selected proteins present a great variety of potential binding sites for Pt (II). It is well known that, according to Pt (II) solution chemistry, it shows a high reactivity with sulfur-containing groups, especially free thiols in Cys and also, with a considerable affinity, the thioether sulfur in Met or the imidazole nitrogens of His, mainly, although other groups such as Thr, Ser, Glu, Asp, Lys, have also been proposed in some cases [13]. Previous studies showed that when both Met and His were present in model peptides, Met were kinetically favoured while His were proposed as the thermodynamically more stable targets on their reaction with Pt(II) compounds, although a

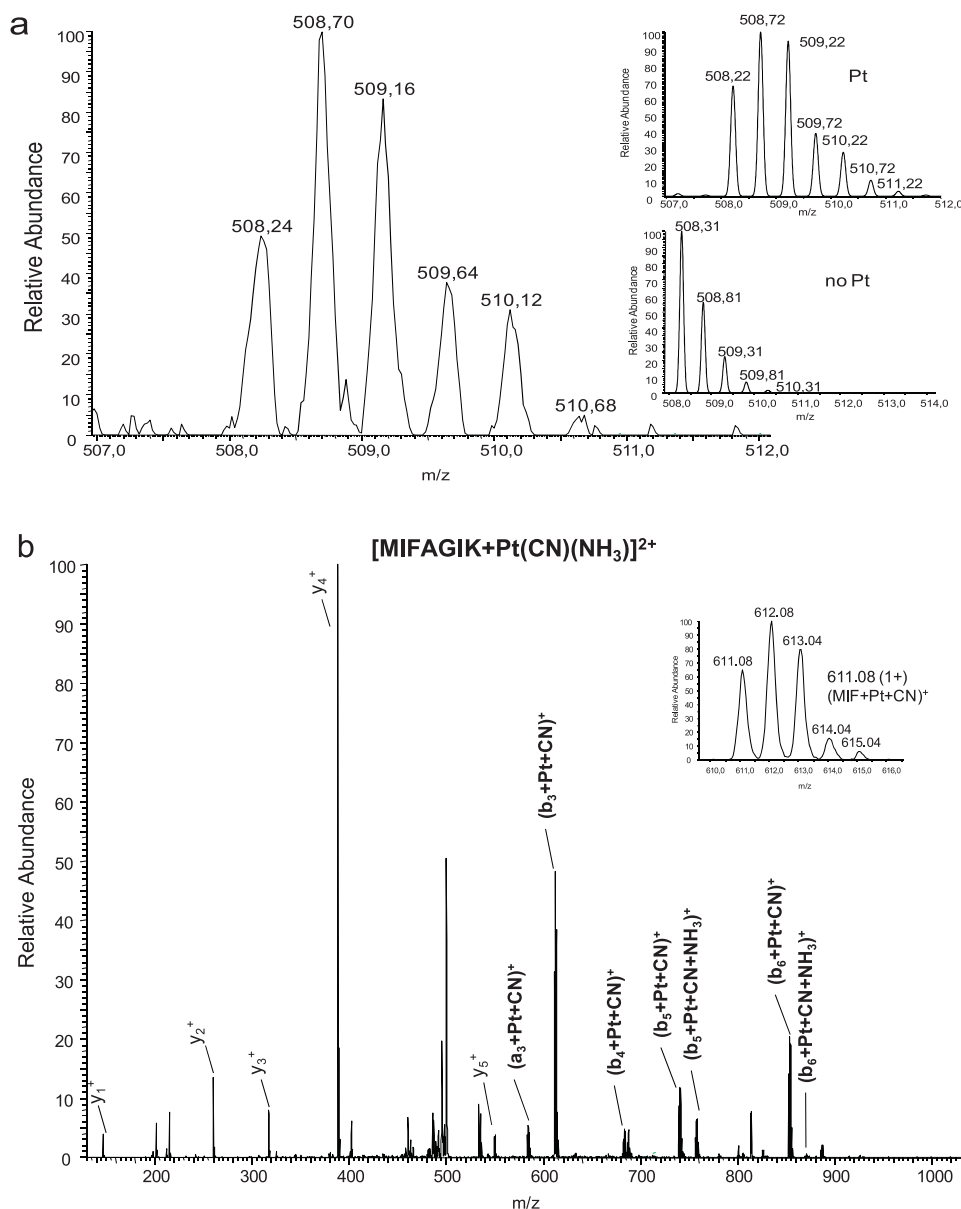


Fig. 1. (a) Zoom scan showing the isotopic pattern of the Pt-modified peptide ion observed at m/z 508.24 (2+) in the in-gel digest of CYT C-cisplatin, corresponding to $[^{80}\text{MIFAGIK}^{86} + \text{Pt}(\text{CN})(\text{NH}_3)]^{2+}$. Insets: theoretical isotopic patterns of a platinated (up) and a regular peptide (down) with the same mass. (b) CID-MS/MS spectrum of the ion at m/z 508.24. Inset: Pt-fragment ion observed at m/z 611.08.

competition and even a simultaneous coordination was also observed [23,24].

3.1. Equine cytochrome c-cisplatin digests

Analysis by nHPLC-ESI-MS/MS of the solution resulting from an in-gel digestion of platinum-bound CYT C allowed its identification with SEQUEST with 99% protein coverage. Furthermore, several peptide ions were detected on the basis of the recognition of a particular isotopic pattern typical of platinum-containing peptides. Equine Cyt C presents 2 methionines and several histidines within its sequence that could be considered as potential binding sites in principle, considering that its cysteines reactivity might be impeded, being in this case involved in heme-group binding. Fig. 1a shows the zoom scan for the peptide ion at m/z 508.24 (2+) with a clear isotopic pattern characteristic of Pt-modified peptides. For comparison, the theoretical isotopic patterns of a peptide with the same mass with and without Pt are shown. The

CID-MS/MS spectrum for this ion allowed its identification as $[^{80}\text{MIFAGIK}^{86} + \text{Pt}(\text{CN})(\text{NH}_3)]^{2+}$, as can be seen in Fig. 1b. Taking a look at the fragments, the presence of a platinated b_3^+ fragment ion at m/z 611.08 (1+), corresponding to $[\text{MIF} + \text{Pt} + \text{CN}]^+$, implies the probable binding of platinum to Met 80 in CYT C. As shown in Fig. S-1, another Pt-containing peptide ion was recognized by its fragmentation pattern at m/z 852.68 (2+), and identified as $[^{61}\text{EETLMEYLENPK}^{72} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$. In this figure an almost complete b series of peptides carrying platinum can be observed, being detectable the platinated a_3 fragment at m/z 523.92 (1+), corresponding to $[\text{EET} + \text{Pt}]^+$. This may be ascribed to the binding of Pt to Glu 61/Glu 62 (E) or Thr 63 (T). However, due to the lack of detectable platinated fragment ions on the y series, the possible binding to the Met 65 present in the peptide cannot be clearly elucidated and the likely dual coordination of platinum to both the potentially reactive Met 65 and the Glu or Thr residues cannot be discarded. Indeed, although there is a slight possibility that NH_3 ligands are released to some extent along the ionization process,

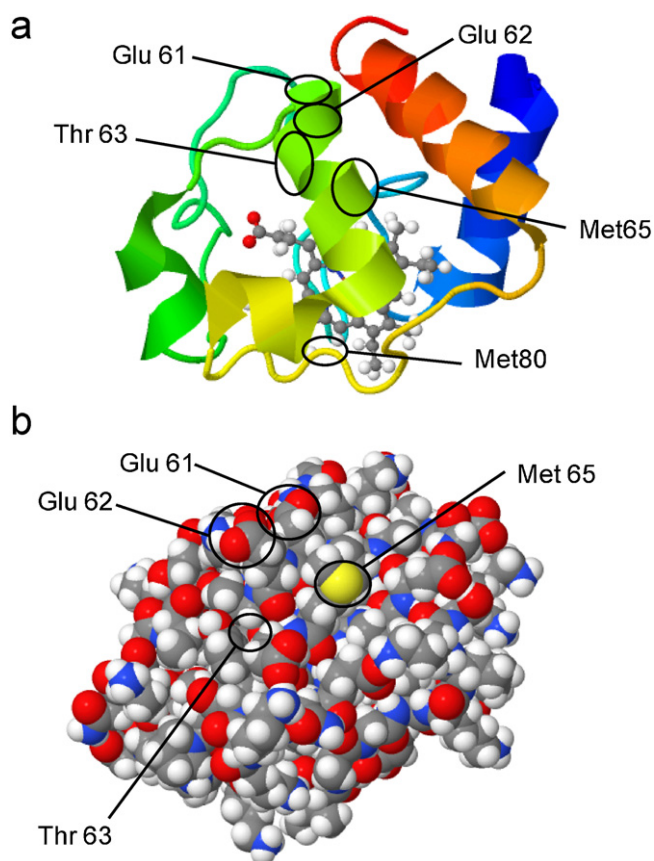


Fig. 2. (a) Schematic and (b) CPK model structures of horse heart cytochrome c, showing the identified cisplatin binding sites. In the CPK model, the atoms color code is the following: H: white, C: grey, O: red, N: blue, S: yellow (Structures retrieved from RSCB Protein Data Bank. ID: 1LC1). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

in this case, the high trans effect induced by the coordination of Pt to S [25] in Met (after the release of the labile Cl^- , or H_2O in the case of aquo-complexes) would facilitate the release of the trans NH_3 ligand and may explain the coordination of Pt to the peptide as a tridentate ligand, as in the case of cisplatin-ubiquitin adducts, where Pt was found to simultaneously coordinate to the sulfur in Met 1, a deprotonated backbone amide NH and the free carboxylate group of the Glu 16/Glu 18 residues [26]. These same results were confirmed by performing in solution digestion of the CYT C–cisplatin adducts. In this case, peptide ions with a very clear PT-modified isotopic pattern were found at m/z 494.60 (2+) and 852.62 (2+). The CID fragmentation of the platinum-containing ions, allowed their identification as: $^{80}\text{MIFAGIK}^{86} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ and again $^{61}\text{EETLMEYLENPK}^{72} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$, respectively (Fig. S-2). Similar results regarding the Pt-binding sites were observed compared to the in-gel digests and further MS³ experiments performed on the in-solution digests allowed the confirmation of Met 65 as Pt-binding site (not shown). The results on the Pt binding sites are in accordance with others previously described [5], in which Met 65 has been proposed as the main binding site for cisplatin in CYT C, while, though less frequently, Met 80 has also been proposed as a secondary site for carboplatin [27]. Taking a look at the 3D structure of the protein (Fig. 2a), Glu 61, Glu 62, Thr 63 and Met 65 are located in an α -helix while Met 80 is located in a loop, being the latter Met coordinated to the Fe atom in the heme group. Considering the surface of the protein based on a CPK model (Fig. 2b), the sulfur atom of Met 65 and the $-\text{COOH}$ groups of Glu 61 and Glu 62 present total superficial accessibility, this not being the case of $-\text{OH}$ in Thr 63. It could be postulated that the coordination of Pt to S in Met

65 occurs in the first place, possibly followed by coordination to N from an amide backbone and finally to Glu 61/Glu 62 promoted by the strong trans effect induced after S coordination. On the other hand, the S atom of Met 80 lays in the inner part of the folded protein. Therefore, considering the location and the surroundings of Met 65, it is reasonable to think that it may be the primary binding site. The fact that cisplatin may also be able to bind to sulfur in Met 80 and therefore, to displace the Fe atom originally coordinated to it, may have biological implications, as recently cleavage of the Fe–Met 80 binding has been related to the translocation of cytochrome c to the cytoplasm and nucleus in non-apoptotic cells [28]. Moreover, an observed release of cytochrome c from the mitochondria membrane was related to conformational changes induced by Pd drugs [29].

When in-solution digestions are performed, notable differences in the ligands attached to the platinum atom bound to Met 80, compared with those found under in-gel conditions, are evidenced. The insertion of a CN^- ligand is only observed during the in-gel digestion and may be related with the repeated use of ACN during several steps of the digestion protocol. Promotion of cleavage of the C–CN bond in nitriles upon coordination to transition metals has been previously observed [30–32]. So in this case, Pt may be acting in such way with ACN (which is able to coordinate to the metallic center) and, in the experimental conditions used, may result in cleavage of the CH_3 –CN bond. Interestingly, no CH_3 ligands were found to remain attached to Pt during the ESI experiments. Also, in light of the fragmentation data, it is worth to mention the notable stability of CN^- coordinated to Pt along the ESI-MS/MS experiments, in contrast to NH_3 ligands, which tend to be easily lost from the fragment ions during the CID activation. Despite the observed exchange of the ligands during the in-gel digestion, Pt is not released from the original binding site and therefore, the location of Pt-binding sites seems not to be affected.

It must be mentioned as well that when in-gel digestion was performed in the presence of DTT and IAA no Pt-peptides were detected by nHPLC–ESI MS/MS analyses. This may be due to the high reactivity of thiol groups towards platinum, which may be sequestered by DTT to a significant extent, impairing the detection of Pt-peptides. The deleterious effect of DTT on metal-binding proteins has been described before. However, in a previous work, Pt-peptides from insulin–cisplatin adducts produced by in-solution digestions were still detectable after DTT and IAA treatments [11]. Consequently, the detection of Pt-peptides probably depends on the amount of Pt-adducts present in the original sample, but also on the strength of the binding, and thus the location in the protein. Therefore, the in-gel digestion protocol, in the absence of steps involving DTT and IAA, seems to be compatible with the preservation of Pt-protein bonds in cytochrome c, and thus appropriate for the characterization of Pt-binding sites. Notably, in this case, Met instead of His were found to be coordinated to Pt.

3.2. Equine myoglobin–cisplatin digests

In-gel digests from myoglobin–cisplatin adducts, analyzed by nHPLC–ESI-MS/MS afforded a 100% protein coverage after SEQUEST search. Equine myoglobin also presents several histidines and methionines available for Pt-coordination. The analysis gave rise to several platinum-containing peptides with a clear platinum profile as can be seen in the zoom scans of ions at m/z 861.30 (2+) and 1055.98 (2+) shown in Figs. 3 and S3, respectively. Fragmentation of 1055.98 (2+) revealed the peptide sequence $^{100}\text{YLEFISDAIIHVLH}^{115} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ as can be seen in Fig. S-3. Aside from a prominent peak corresponding to the neutral loss of both ammine ligands, Pt-containing fragments could be observed along both b and y series. In particular, the first platinumated y fragment was found at 563.2 (1+) and the first platinumated

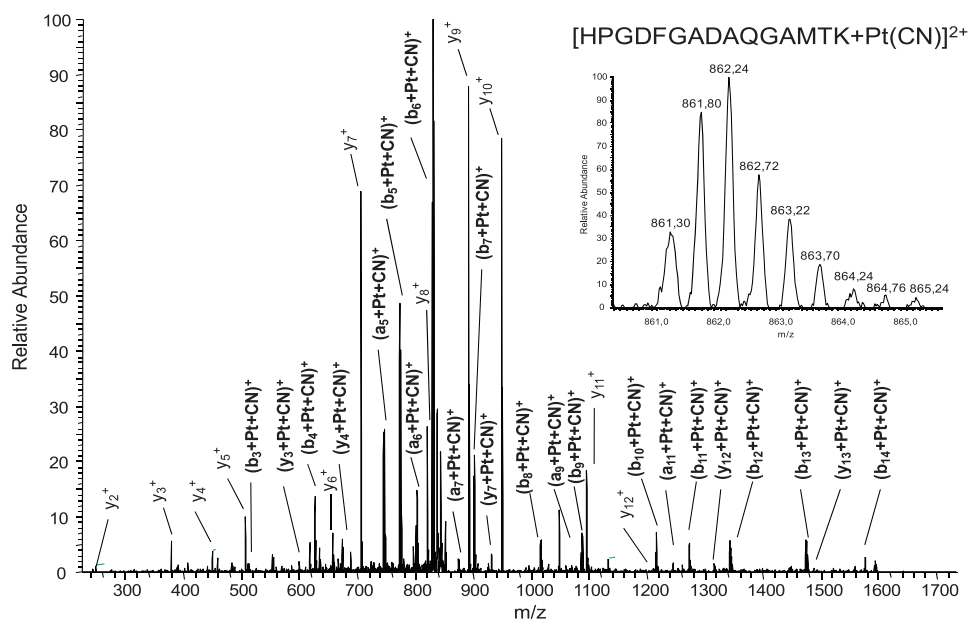


Fig. 3. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 861.30 ($2+$), corresponding to $[^{119}\text{HPGDFGADAQGAMTK}^{133} + \text{Pt}(\text{CN})]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of MYO-cisplatin. Inset: zoom scan MS of the platinated precursor ion.

b fragment appeared at 1494.5 ($1+$), corresponding to $[\text{HSK} + \text{Pt}]^+$ and $[\text{YLEFISDAIIH} + \text{Pt}]^+$, respectively. In light of the fragments observed, it can be concluded that both His 113 and His 116 can be considered as platinum-binding sites in myoglobin. On the other hand, as is shown in Fig. 3, the CID-MS/MS spectrum for the peptide at 861.30 ($2+$) allowed its identification as $[^{119}\text{HPGDFGADAQGAMTK}^{133} + \text{Pt}(\text{CN})]^{2+}$. A closer look at the fragment ions present at the MS/MS spectrum reveals that the platinated b_3^+ ion $[\text{HPG} + \text{Pt} + \text{CN}]^+$ at 511.16 ($1+$) can be observed, in addition to the platinum-containing y_3^+ ion at 599.08 ($1+$), corresponding to $[\text{MTK} + \text{Pt} + \text{CN}]^+$. Consequently, His 119 and Met 131 can be proposed as additional Pt-binding sites in myoglobin. In this case, considering that Pt bound to the peptide has only one additional ligand attached to it, a possible dual coordination to the His and Met residues, in addition to nitrogen from either the N-terminus or the amide backbone, facilitated by the ammine release induced by the trans effect induced by S-coordination in Met, could be proposed.

The analysis of in-solution digests from the myoglobin-cisplatin model, also gave rise to platinated peptides at m/z 1056.00 and 856.16. The fragmentation of the previous ions allowed their identification as the previously observed $[^{100}\text{YLEFISDAIIHVLH}^{115} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ and as $[^{119}\text{HPGDFGADAQGAMTK}^{133} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, respectively, involving the same binding sites as the ones described above (Fig. S-4). Again, a remarkable difference on the ligands attached to platinum in the peptide involving His 119 and Met 131 compared to in-gel digestion could be observed, being the original ligands displaced by a CN^- ligand during the in-gel digestion process, as was previously detected for the case of cytochrome c. In any case, similar results were obtained both with in-gel and in-solution digestions. Furthermore, results are in agreement with data previously reported, where His 116 and His 119 were found as binding sites for cisplatin in myoglobin [7] but, in this case, His 113 and Met 131 have also turned out to be other possible binding sites in the protein. Regarding the protein structure, His 113, His 116 and His 119 are located in the same α -helix and Met 131 is in an adjacent α -helix (Fig. S-5a). Considering the CPK model for myoglobin (Fig. S-5b), all the imidazole rings in histidines are present with higher accessibility at the surface of the protein, while Met 131

seems to be located in an inner part of the protein structure, thus less reachable for cisplatin. Considering these facts, the primary binding to His 113, 116 and 119 seems to be likely. Remarkably, although the protein has both Met and His within several parts of its sequence, in this case Pt seems to have preference for the accessible His-rich area.

On the other hand, the use of DTT and IAA during the in-gel digestion process, yielded Pt-peptides that were visible in the nHPLC-ESI-MS/MS analysis only at m/z 1056.00 ($2+$) (data not shown), involving His 113 and His 116, as previously mentioned. However, no evidence on the binding of Pt to His 119 or Met 131 was found using this approach, evidencing once more the deleterious effect of thiol-containing reagents on the Pt-peptide bonds.

3.3. Bovine carbonic anhydrase-cisplatin digests

nHPLC-ESI-MS/MS analysis of the in-gel digests prepared from CA-cisplatin bands was carried out, yielding a 78% protein coverage. Several ions were detected with an isotopic pattern expected from Pt-containing peptides. Figs. 4 and S-6 show the zoom scans corresponding to such ions, found at m/z 413.88 ($3+$) and 678.78 ($2+$). The CID-MS/MS of the precursor ion at 413.88 ($3+$), shown in Fig. 4, revealed its sequence as $[\text{Ac-SHHWGYGK}^8 + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{3+}$. In this case, the first platinated ion in the b series, b_3^{2+} , was found at 315.60 ($1+$), corresponding to $[\text{Ac-SHH} + \text{Pt} + 2\text{NH}_3]^{2+}$. On the other hand, the first Pt-containing ion in the y series was y_6^{2+} at 487.60 ($2+$), corresponding to $[\text{HWGYGK} + \text{Pt} + 2\text{NH}_3]^{2+}$. Taking a look at the mentioned fragments present in the spectrum, His 3 is disclosed as a clear binding site for platinum in carbonic anhydrase II. However, as no b_2 fragment ion was observed, a bifunctional coordination of Pt to both His 2 and His 3 is likely and could be proposed. Regarding the peptide ion at m/z 678.78 ($2+$), its fragmentation pattern suggested its sequence as $[\text{HNGPEHWHK}^{17} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, as can be seen in Fig. S-6. In this case, the main fragmentation pathway observed consisted on the neutral loss of NH_3 , while scarce additional fragments were observed. Notably, no b series regular ions could be observed and only platinated b ions were present from b_6^+ , $[\text{HNGPEH} + \text{Pt}]^+$, onwards. On the other hand, unplatinated y ions were observed until y_3 was reached but no platinated y ions were visible along the y series. Therefore His 9 and His 14



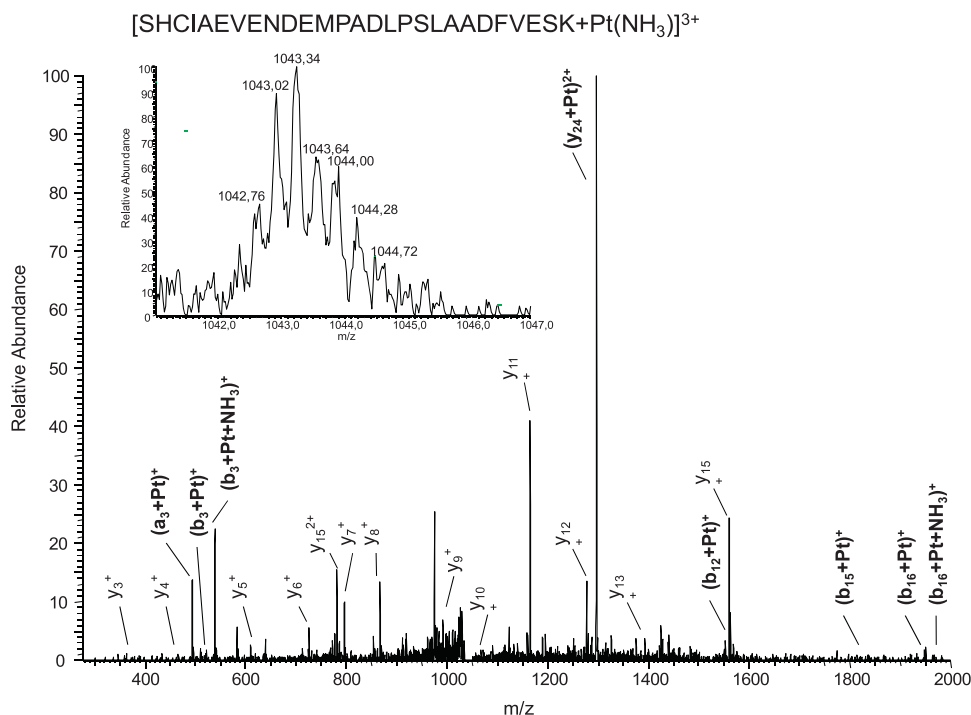


Fig. 6. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 1042.73 ($3+$), corresponding to $[^{287}\text{SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK}^{313} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{3+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of HSA-cisplatin. Inset: zoom scan MS of the platinated precursor ion.

mentioned reagents. Interestingly, the rest of the processes involved in the conventional in-gel digestion have been proved again to be able to allow determining Pt-binding sites in carbonic anhydrase.

3.4. Human serum albumin-cisplatin digests

In-gel digestions in non-reducing conditions were prepared on HSA-Pt bands from SDS-PAGE. Digests were analyzed by nHPLC-ESI-MS/MS, allowing the identification of the protein with 38.9% coverage of the aminoacid sequence. This low coverage obtained is due to the fact that the protein presents numerous disulfide bonds and no reduction was performed. Nevertheless, Pt-containing peptide ions were recognized according to their isotopic pattern at m/z 925.44, 843.94 and 1042.76, as can be seen in Figs. S-7, S-8 and 6, respectively. The fragmentation by CID of the ion at 925.44 ($2+$) allowed its identification, turning out to be $[^{324}\text{DVFLGMFLYEYAR}^{336} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, as shown in Fig. S-7. In the CID-MS/MS, non-platinated ions from the y series could be followed up to y_7^+ , $[\text{FLYEYAR}]^+$, but the sequence could not be continued further, as can be seen in Fig. S-7. Moreover, no unplatinated ions in the b series could be found while b Pt-ions were present indeed, the first one, b_6^+ , appearing at 855.20 ($1+$) and 872.24 ($1+$), corresponding to $[\text{DVFLGM} + \text{Pt}]^+$ and $[\text{DVFLGM} + \text{Pt} + \text{NH}_3]^+$, respectively. Therefore, considering the fragmentation pattern observed, platinum can be proposed to be coordinated to the Met 329 in HSA. On the other hand, the Pt-ion observed at 843.94 ($2+$) was fragmented, as shown in Fig. S-8, revealing its sequence as $[^{337}\text{RHPDYSVLLLR}^{348} + \text{Pt}(\text{CN})]^{2+}$. This peptide presents again a CN^- ligand attached to platinum probably due to the exchange of the original NH_3 by acetonitrile, followed by C-CN cleavage, as described before for cytochrome c and myoglobin. Among the fragments produced, a platinated b_2^+ ion was observed at m/z 513.08, corresponding $[\text{RH} + \text{Pt} + \text{CN}]^+$, while exclusively unplatinated fragment ions were observed within the y series, being y_{10}^+ , $[\text{PDYSVLLLR}]^+$, at m/z 1174.56, the last one visible, suggesting that

platinum may be bound to His 338 as well. Regarding the peptide ion at 1042.73 ($3+$), its CID-MS/MS spectrum allowed its identification as $[^{287}\text{SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK}^{313} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{3+}$, as can be seen in Fig. 6. Considering the MS/MS spectrum, a platinated b_3^+ ion can be assigned at m/z 537.08 ($1+$), $[\text{SHC} + \text{Pt} + \text{NH}_3]^+$, being the first Pt-ion in the b series. Moreover, no unplatinated b ions were found. On the other hand, fragment ions belonging to the y series were found with no platinum until y_{15}^+ , $[\text{DLPSLAADFVESK}]^+$. Onwards, no more y ions in the series were found, except for y_{24}^{2+} , at 1245.48 ($2+$), corresponding to $[\text{IAEVENDEMPADLPSLAADFVESK} + \text{Pt}]^{2+}$. As a result, it could be concluded that platinum may be bound to either His 288 or Cys 289, and in light of the detection of the platinated y_{24}^{2+} fragment, the binding to Met 298 would also be most likely. It is interesting to remark that Cys 289 is participating in a disulfide bond in native HSA, so the fact that it is seen free and bound to platinum when digested under non-reducing conditions, may indicate that platinum could be able to disrupt the original S-S bond after coordinating to Cys 289. This fact was previously reported during a top-down insulin-cisplatin adducts characterization [9]. On the other hand, the fact that only one ammine ligand remains attached to Pt can also be explained by the presence of several simultaneous binding sites in the peptide and by the trans effect induced after coordination to S in Met or Cys, enhancing the release of an original NH_3 ligand.

When the in-gel digestion was performed under reducing conditions (using DTT and IAA during the process), the aminoacid coverage reached was considerably higher (77.5%). However, only the platinated ion at 1061.70 ($3+$), corresponding to $[^{287}\text{SHC}^*\text{IAEVENDEMPADLPSLAADFVESK}^{313} + \text{Pt}(\text{NH}_3)]^{3+}$, could be detected in the chromatogram. In this case, in the MS/MS spectrum (Fig. S-9), the first platinated b ion found was b_{12}^{2+} at 812.76 ($2+$), corresponding to $[\text{SHC}^*\text{IAEVENDEM} + \text{Pt} + \text{NH}_3]^{2+}$, and no other platinated b ions where detected below b_{12} . Furthermore, a very intense unplatinated y_{15}^+ ion at 1559.68 ($1+$), $[\text{PADLPSLAADFVESK}]^+$, was also observed, in addition to a first

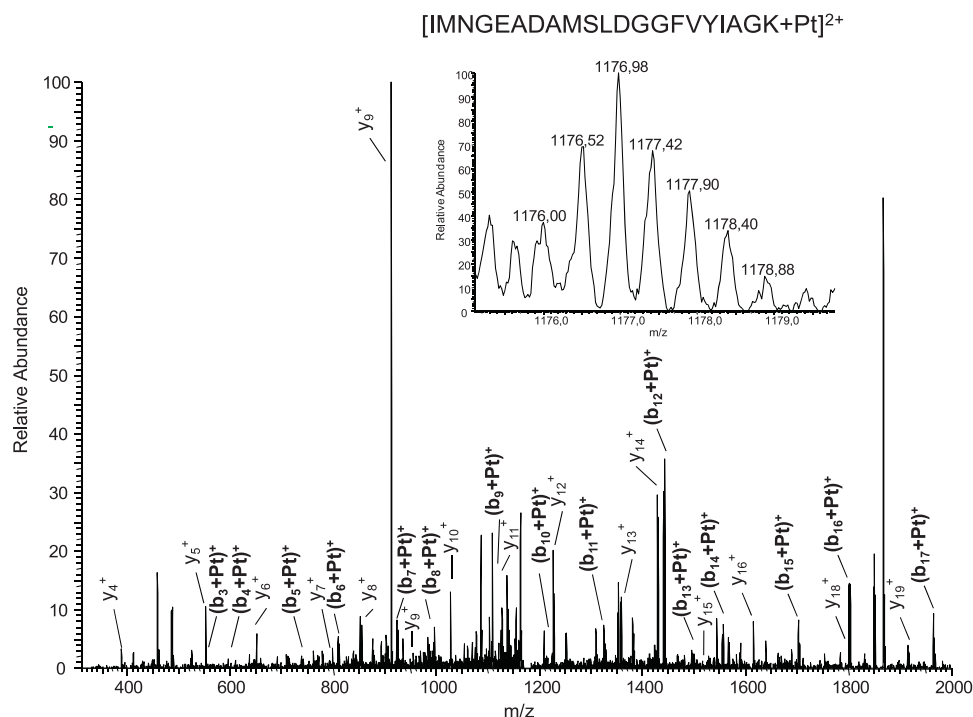


Fig. 7. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 1176.00 ($2+$), corresponding to $[^{381}\text{IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK}^{401} + \text{Pt}]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of TF-cisplatin. Inset: zoom scan MS of the platinated precursor ion.

platinated ion at the y series at m/z 1014.88 ($2+$), $[\text{DEMPADLP-SLAADFVESK} + \text{Pt}]^{2+}$. Therefore, according to these facts, Met 298 would also be clearly involved in the binding to platinum, aside from the previously observed Cys 289 and His 288. In spite of the higher protein coverage, no other Pt-peptides were detected, most probably due to the effect of DTT in the Pt-peptides already observed. Regarding in-solution digestions using reduction and alkylation, the same results were obtained, confirming the previous observations.

As can be seen in the protein structure shown in Fig. S-10a, Cys 289/His 288 and Met 329 are located in different α -helices while Met 298 and His 338 belong to different loops. On the other hand, taking a look at the protein surface in a CPK model (Fig. S-10b), the sulfur atoms of Met 298, Met 329 and Cys 289 and the imidazole rings of His 338 and partially of His 288, are located at the surface, and therefore, are highly accessible for cisplatin, confirming the observed results on the binding sites. These observations are in accordance with previous NMR results [33] proposing Met 298 as the primary binding site for cisplatin in HSA and that superficial histidines can be potential binding sites too. By using a MudPIT approach, Met 329 was also found as a Pt-binding site [12]. Considering the location of the residues in the protein structure, the neighboring His 288 and Cys 289 are located relatively far from Met 298, being their simultaneous binding to Pt unlikely, although they can be proposed as binding sites separately. Therefore, in this case both His and Met residues were found to be competing binding sites for cisplatin.

3.5. Human serotransferrin-cisplatin digests

Gel bands containing transferrin-cisplatin adducts were also digested in-gel and analyzed by nHPLC-ESI-MS/MS. It should be noted that due to the high amount of disulfide bonds in transferrin, only 39% aminoacid coverage was obtained. In the chromatogram, a doubly charged peptide ion bearing a platinum-like isotopic pattern was observed at m/z 1176.00. Fig. 7 shows the

CID-MS/MS spectrum of the mentioned ion, which turned out to be $[^{381}\text{IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK}^{401} + \text{Pt}]^{2+}$. Taking a closer look at the fragment ions produced, it can be seen that platinated ions from the b series were detected from b_3^+ onwards, at 551.32 ($1+$), corresponding to $[\text{IMN} + \text{Pt}]^+$, while no unplatinated b ions were observed. On the other hand, clear fragments without platinum belonging to the almost complete y series were observed, until y_{19}^+ , $[\text{NGEADAMSLDGGFVYIAGK}]^+$, was reached. However, no platinated ions could be assigned in the y series. According to these results, platinum would be most probably coordinated to Met 382. This is in agreement with a previous work, where Met 382 was found as a cisplatin binding site in the protein too, being also Glu 385 proposed [12]. Considering the protein structure (Fig. S-11a), Met 382 is located in an α -helix while Glu 385 is in a loop, but the Glu 385 residue is located at the surface and thus, in principle, would be more accessible for cisplatin, as can be seen in Fig. S-11b. In this case, the lack of ligands remaining attached to Pt in the adduct detected may reflect the enhanced NH_3 release due to the trans effect promoted after Met S-coordination and would point to the possible binding to several simultaneous sites in the peptide. When the in-gel digestion was performed including reduction with DTT and alkylation with IAA, the protein coverage was increased to 69%. However, no Pt-peptides could be recognized after nHPLC-ESI-MS/MS analysis despite the higher protein coverage, probably due to the deleterious effects of DTT on the Pt-protein binding. In-solution digestions produced similar results but in this case, either under the use of reduction and alkylation steps or omitting the previous steps, the mentioned peptide ion could be detected. Probably, during the in-solution digestions performed, which involved less amount of steps for sample treatment, platinum could be preserved better. Again, as observed for albumin, surprisingly, the increase of aminoacid coverage obtained after the use of DTT and IAA did not result in the identification of a higher amount of Pt-peptides probably due to the effect of DTT. However, the in-gel digestion process itself allowed the identification of Pt-peptides in the protein.

4. Conclusions

In light of the results by nHPLC–ESI-MS/MS for the standard proteins studied, the conventional tryptic in-gel digestion protocol seems to be suitable for the characterization of Pt-proteins. The use of ammonium bicarbonate, acetonitrile and formic acid along the steps involved in the tryptic digestion seems to be appropriate for the preservation of Pt-protein bonds. However, the repeated use of acetonitrile may result in the substitution by CN[−] of some of the original ligands attached to platinum, which does not affect the original binding sites in the protein. Anyway, this modification has to be born in mind if a search engine is used for assisting on the recognition and identification of Pt-peptides, considering the mass of the platinum modification.

By using this in-gel approach, relatively simple Pt-binding proteins, such as cytochrome c, myoglobin and carbonic anhydrase have been fully characterized regarding the binding sites for cisplatin: Met 65, Glu 61/Glu 62/Thr 63 and Met 80 for CYT C; His 113, His 116, His 119 and possibly Met 131 for MYO, His 2/His 3, His 9/His 14 for CA-II. On the other hand, during the study of more complex proteins, such as albumin or transferrin, the in-gel digestion also proved to be appropriate for the identification of Pt binding sites: Met 329, His 338, His 288/Cys 289, Met 298 in HSA; Met 382 in TF. In general, results point out the competition of His and Met residues towards platinum binding, and the fact that their selectivity may also depend on the accessibility of their side chains. However, for a comprehensive study of the binding sites in such proteins, with a considerably high amount of cysteines, reduction and alkylation of cysteines involved in disulfide bonds may be required. In this work, the use of DTT as a reducing agent has proved not to be recommendable, as it seems to hamper the localization of Pt-binding sites. Thiol groups in DTT, reactive towards platinum may, probably, cleave the original Pt-protein binding to some extent, being the increase in protein coverage at the cost of the preservation of certain Pt-protein bonds. Therefore, other non-thiol-containing reducing agents will be investigated for this purpose in future work.

Overall, the in-gel digestion procedure seems to be appropriate for the characterization of Pt-binding proteins, implying that the whole bottom-up approach based on the separation of proteins by 2-DE, followed by tryptic digestion of Pt-spots and analysis by nHPLC–ESI-MS/MS may be suitable for the detection of Pt-peptides and therefore the identification of Pt-binding proteins in biological samples.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Spanish CICYT project CTQ-2008-04873.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.talanta.2011.11.044.

References

- [1] V. Cepeda, M.A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, J.M. Perez, *Anti-cancer Agent Med. Chem.* 7 (2007) 3–18.
- [2] D. Esteban-Fernandez, E. Moreno-Gordaliza, B. Canas, M.A. Palacios, M.M. Gomez-Gomez, *Metallomics* 2 (2010) 19–38.
- [3] I. Khalaila, C.S. Allardyce, C.S. Verma, P.J. Dyson, *Chem. Biochem.* 6 (2005) 1788–1795.
- [4] M. Knipp, A.V. Karotki, S. Chesnov, G. Natile, P.J. Sadler, V. Brabec, M. Vasak, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 4075–4086.
- [5] T. Zhao, F.L. King, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 20 (2009) 1141–1147.
- [6] C.G. Hartinger, Y.O. Tsybin, J. Fuchser, P.J. Dyson, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 17–19.
- [7] T. Zhao, F.L. King, *J. Inorg. Biochemistry* 104 (2010) 186–192.
- [8] V. Calderone, A. Casini, S. Mangani, L. Messori, P.L. Orioli, *Angew. Chem. Int. Edit.* 45 (2006) 1267–1269.
- [9] E. Moreno-Gordaliza, B. Canas, M.A. Palacios, M.M. Gomez-Gomez, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3507–3516.
- [10] C.G. Hartinger, W.H. Ang, A. Casini, L. Messori, B.K. Keppler, P.J. Dyson, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 960–967.
- [11] E. Moreno-Gordaliza, B. Canas, M.A. Palacios, M.M. Gomez-Gomez, *Analyst* 135 (2010) 1288–1298.
- [12] J. Will, D.A. Wolters, W.S. Sheldrick, *Chem. Med. Chem.* 3 (2008) 1696–1707.
- [13] J. Will, W.S. Sheldrick, D. Wolters, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 421–434.
- [14] O. Carrette, P.R. Burkhard, J.-C. Sanchez, D.F. Hochstrasser, *Nat. Protocols* 1 (2006) 812–823.
- [15] J.S. Becker, M. Zoriy, A. Matusch, B. Wu, D. Salber, C. Palm, J.S. Becker, *Mass Spectrom. Rev.* 29 (2010) 156–175.
- [16] A. Raab, B. Ploselli, C. Munro, J. Thomas-Oates, J. Feldmann, *Electrophoresis* 30 (2009) 303–314.
- [17] M.L. Mena, E. Moreno-Gordaliza, I. Moraleja, B. Cañas, M.M. Gómez-Gómez, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1281–1290.
- [18] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, F.R. Abou-Shakra, H. Birtwistle, J. Coffey, *Chem. Commun.* (2001) 2708–2709.
- [19] I. Khalaila, A. Bergamo, F. Bussy, G. Sava, P.J. Dyson, *Int. J. Oncol.* 29 (2006) 261–268.
- [20] L. Tastet, D. Schaumlöffel, B. Bouysiere, R. Lobinski, *Talanta* 75 (2008) 1140–1145.
- [21] J.S. Becker, D. Pozebon, V.L. Dressler, R. Lobinski, J.S. Becker, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 23 (2008) 1076–1082.
- [22] J.S. Becker, S. Mounicou, M.V. Zoriy, J.S. Becker, R. Lobinski, *Talanta* 76 (2008) 1183–1188.
- [23] C.D.W. Frohling, W.S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 4411–4420.
- [24] S. Manka, F. Becker, O. Hohage, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1947–1956.
- [25] J.K.-C. Lau, D.V. Deubel, *Chem. Eur. J.* 11 (2005) 2849–2855.
- [26] J.P. Williams, H.I.A. Phillips, I. Campuzano, P.J. Sadler, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 21 (2010) 1097–1106.
- [27] G.S. Yang, R. Miao, C. Jin, Y.H. Mei, H.W. Tang, J. Hong, Z.J. Guo, L.G. Zhu, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 1005–1016.
- [28] L.C. Godoy, C. Munoz-Pinedo, L. Castro, S. Cardaci, C.M. Schonhoff, M. King, V. Tortora, M. Marin, Q. Miao, J.F. Jiang, A. Kapralov, R. Jemmerson, G.G. Silkstone, J.N. Patel, J.E. Evans, M.T. Wilson, D.R. Green, V.E. Kagan, R. Radi, J.B. Mannick, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 2653–2658.
- [29] S. Emami, H. Ghourchian, A. Divsalar, *Int. J. Biol. Macromol.* 48 (2011) 243–248.
- [30] J.J. Garcia, W.D. Jones, *Organometallics* 19 (2000) 5544–5545.
- [31] D. Churchill, J.H. Shin, T. Hascall, J.M. Hahn, B.M. Bridgewater, G. Parkin, *Organometallics* 18 (1999) 2403–2406.
- [32] T. Tanabe, M.E. Evans, W.W. Brennessel, W.D. Jones, *Organometallics* 30 (2011) 834–843.
- [33] A.I. Ivanov, J. Christodoulou, J.A. Parkinson, K.J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P.J. Sadler, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14721–14730.

Characterization of Pt-protein complexes by nHPLC-ESI-LTQ MS/MS using a gel-based bottom-up approach

Estefanía Moreno-Gordaliza, Benito Cañas, María A. Palacios, M. Milagros Gómez-Gómez*

Department of Analytical Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

*Corresponding author: Prof. Dr. M. Milagros Gómez-Gómez. E-mail: mmgomez@quim.ucm.es. Phone : +34 91 394 51 46. Fax: +34 91 394 43 29

APPENDIX A - SUPPLEMENTARY DATA

The present document provides further information on the paper mentioned above.

Contents:

- Figures S-1 to S-11.

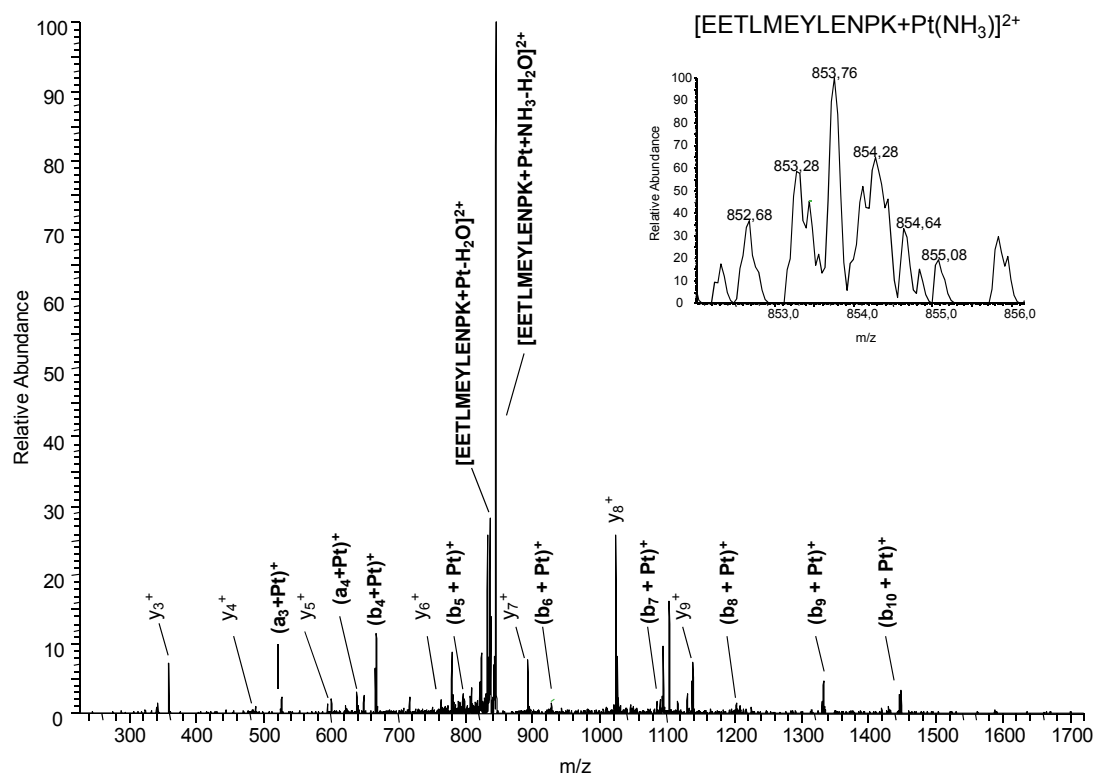


Figure S-1. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 852.68 ($2+$), corresponding to $[^{61}\text{EETLMEYLENPK}^{72}+\text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of CYT C-cisplatin. Inset: Zoom scan MS of the platinated precursor ion.

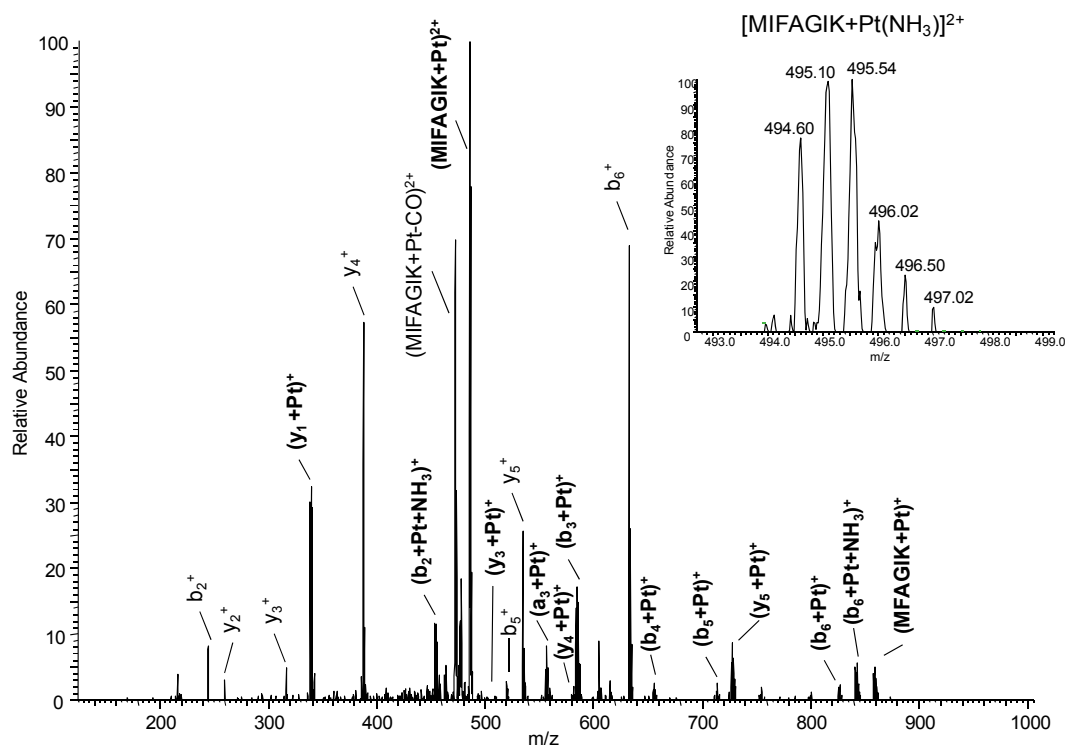


Figure S-2. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 494.60 ($2+$), corresponding to $[^{80}\text{MIFAGIK}^{86}+\text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-solution digests of CYT C-cisplatin. Inset: Zoom scan MS of the platinated precursor ion.

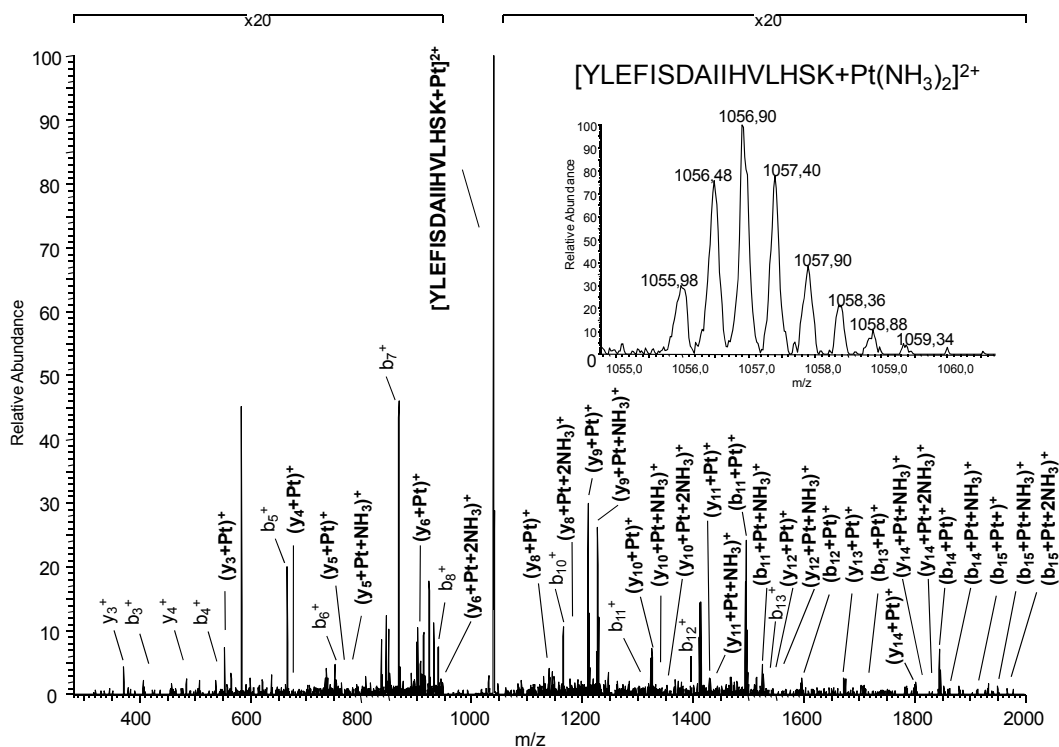


Figure S-3. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 1055.98 (2+), corresponding to $[^{100}\text{YLEFISDAIIHVLHSK}^{115} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of MYO-cisplatin. Inset: Zoom scan MS of the platinated precursor ion.

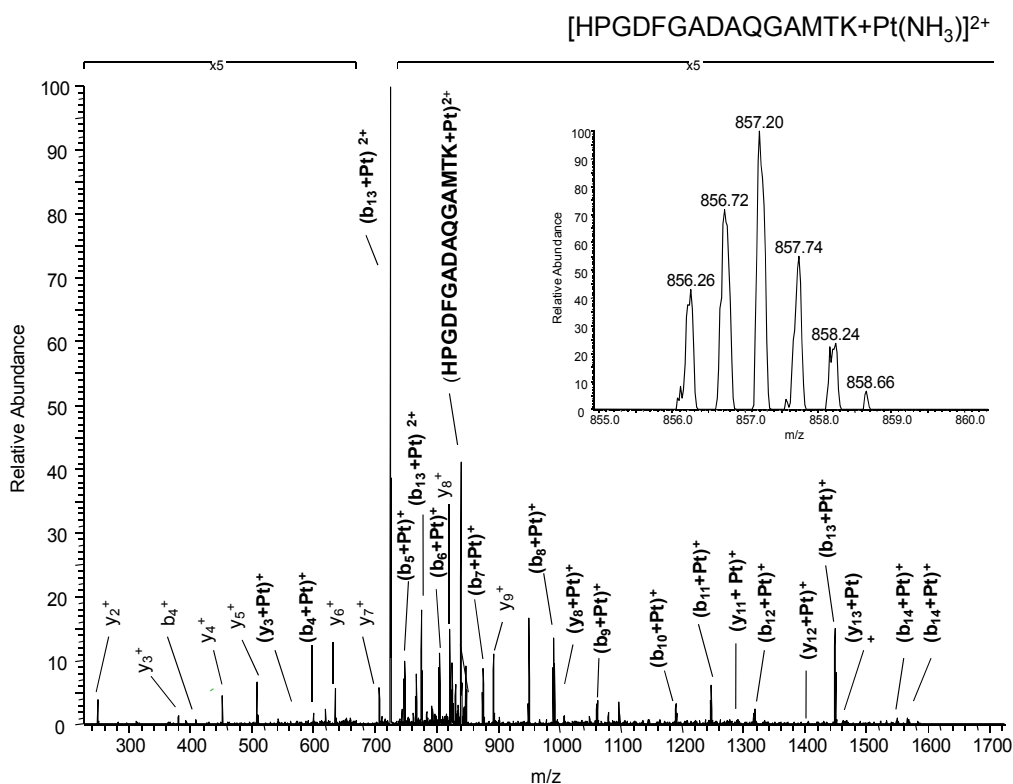


Figure S-4. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 856.26 (2+), corresponding to $[^{119}\text{HPGDFGADAQGAMTK}^{133}+\text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-solution digests of MYO-cisplatin. Inset: Zoom scan MS of the platinated precursor ion.

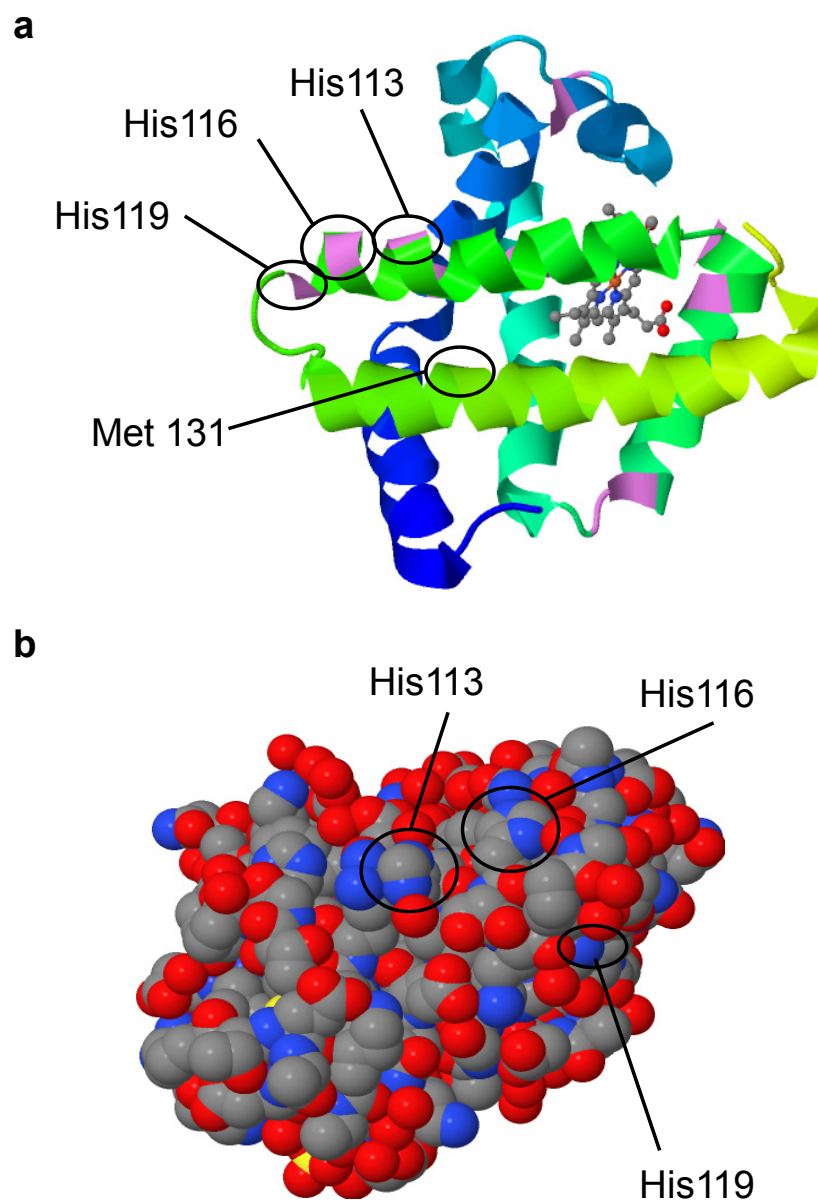


Figure S-5. a) Schematic and b) CPK balls model structures of horse heart myoglobin, showing the identified cisplatin binding sites (Protein Data Bank ID: 1WLA). In the CPK model, the atoms color code is the following: C: grey, O: red, N: blue, S: yellow.

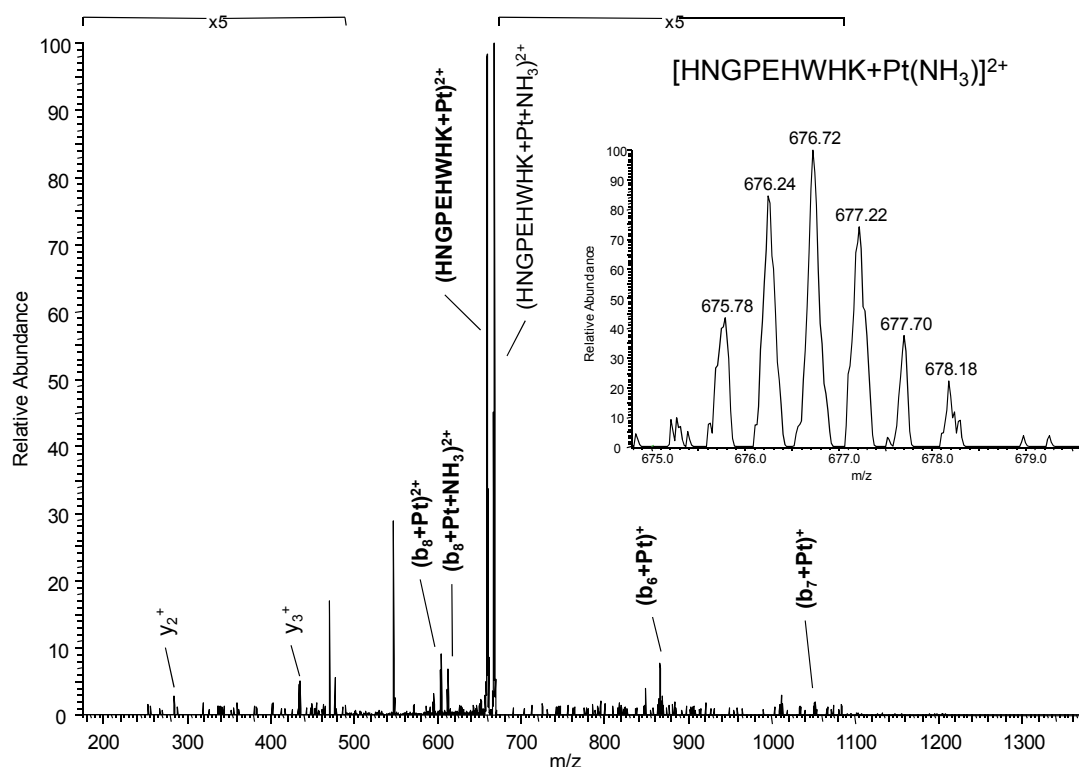


Figure S-6. CID-MS/MS spectrum of the platinated peptide ion at m/z 675.78 ($2+$), corresponding to $[^9\text{HNGPEHWHK}^{17}+\text{Pt}(\text{NH}_3)]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of CA-cisplatin. Inset: Zoom scan MS of the platinated precursor ion.

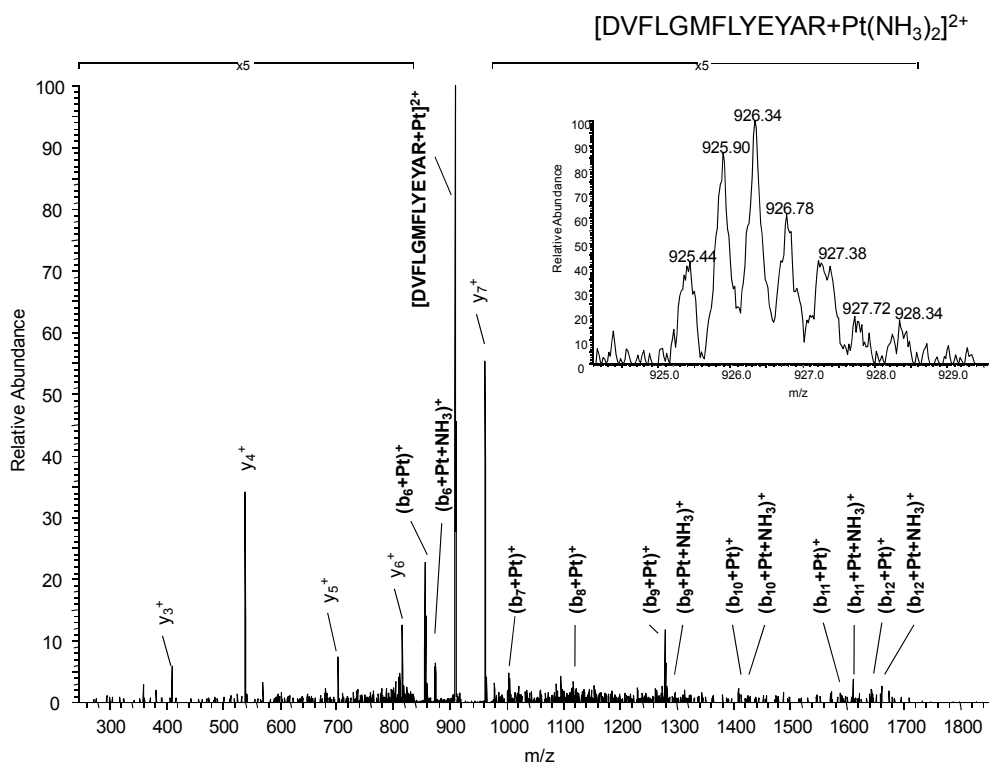


Figure S-7. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 925.44 ($2+$), corresponding to $[^{324}\text{DVFLGMFLYEYAR}^{336}+\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of HSA-cisplatin. Inset: Zoom scan MS of the platinated precursor ion.

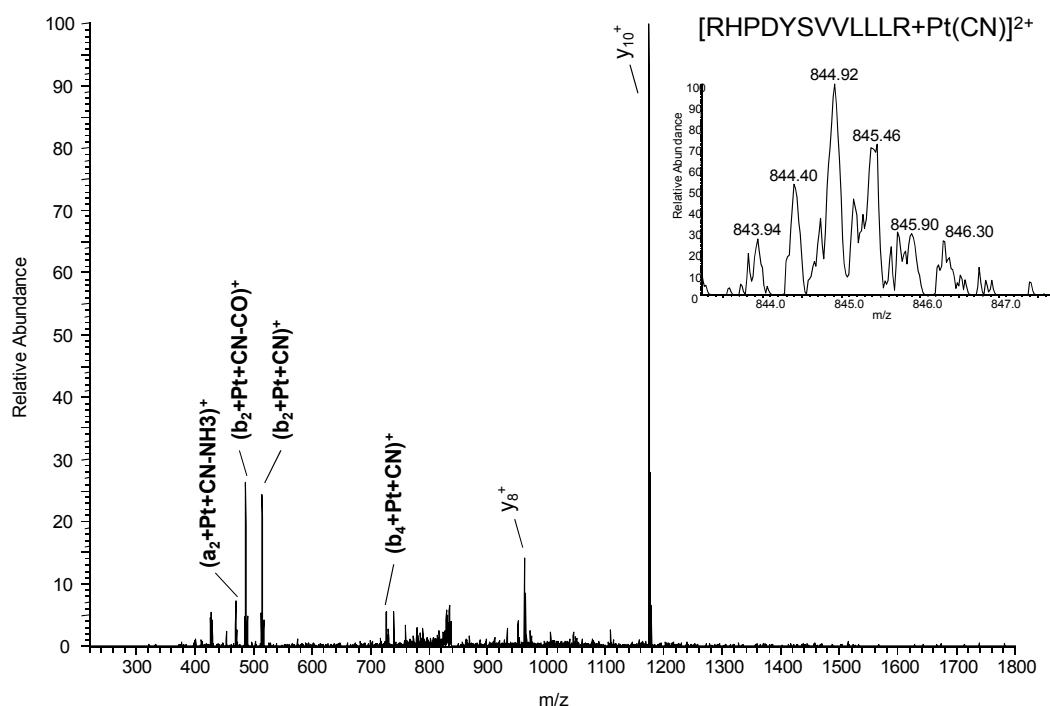


Figure S-8. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion at m/z 843.94 (2^+), corresponding to $[^{337}\text{RHPDYSVLLLR}^{348}+\text{Pt}(\text{CN})]^{2+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of HSA-cisplatin. Inset: Zoom scan MS of the platinated precursor ion.

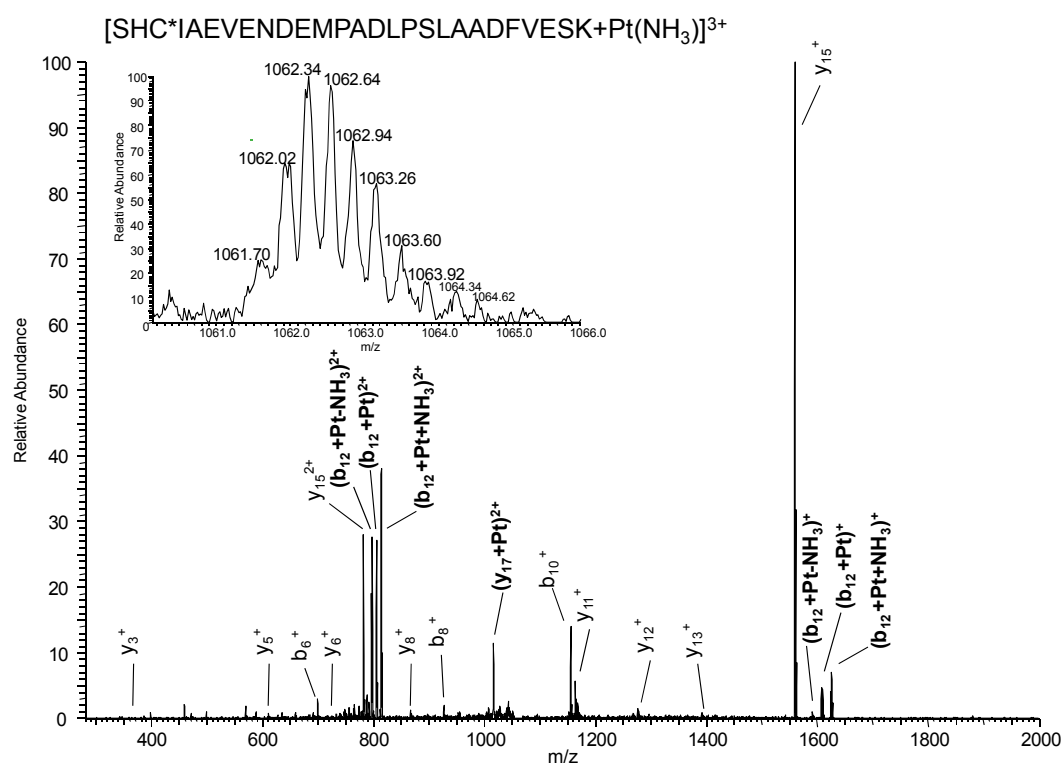


Figure S-9. CID-MS/MS spectrum of the ion at m/z 1061.70 (3^+), corresponding to $[^{287}\text{SHC}^*\text{IAEVENDEMPADLPSLAADFVESK}^{313}+\text{Pt}(\text{NH}_3)]^{3+}$, observed during the nHPLC-ESI-MS analysis of in-gel digests of HSA-cisplatin, where reduction and alkylation with DTT and IAA were applied. Inset: Zoom scan MS of the platinated precursor ion.

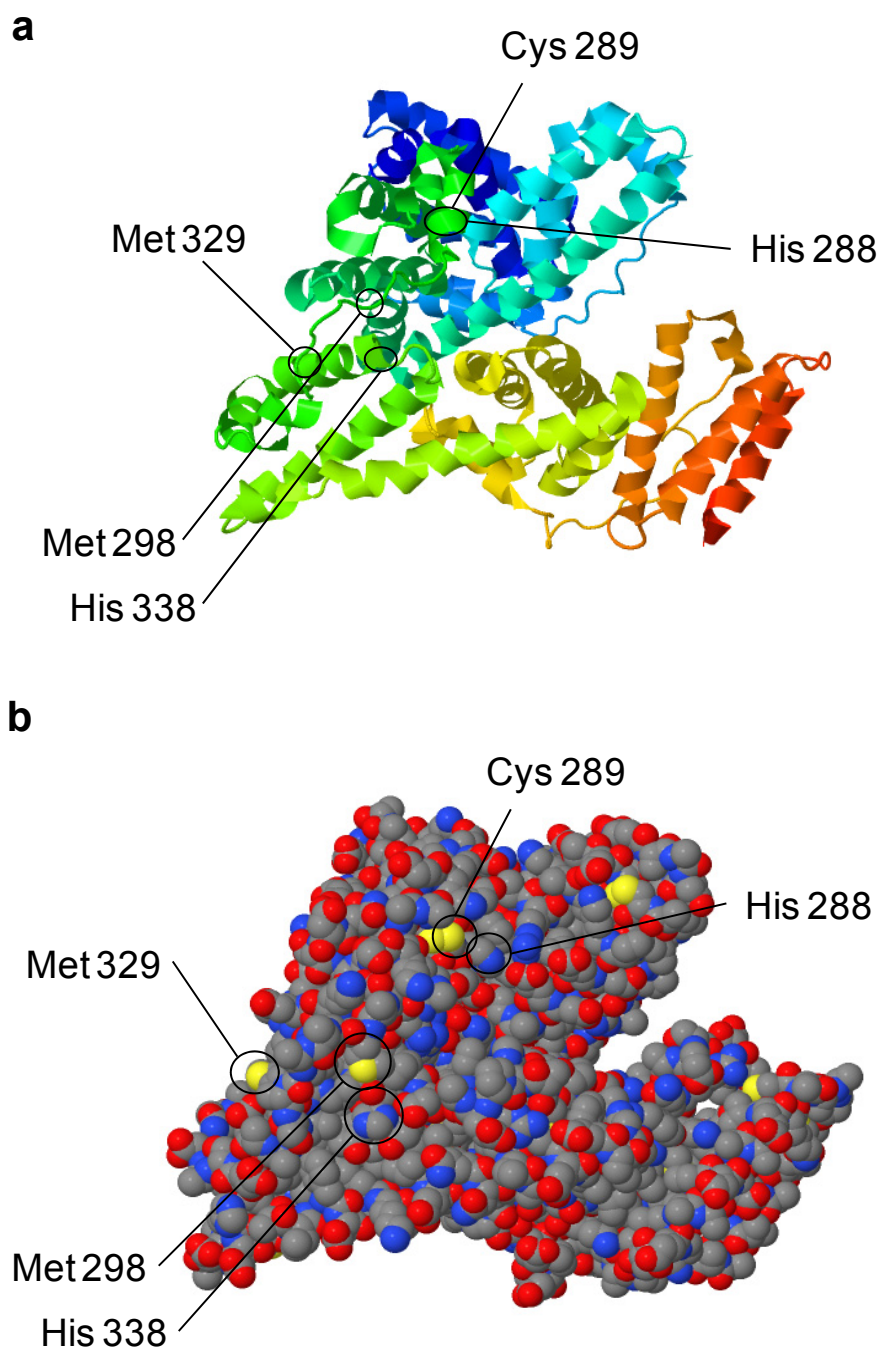


Figure S-10. a) Schematic and **b)** CPK balls model structures of human serum albumin, showing the identified cisplatin binding sites. In the CPK model, the atoms color code is the following: C: grey, O: red, N: blue, S: yellow. (Structures retrieved from RSCB Protein Data Bank. ID: 1E78).

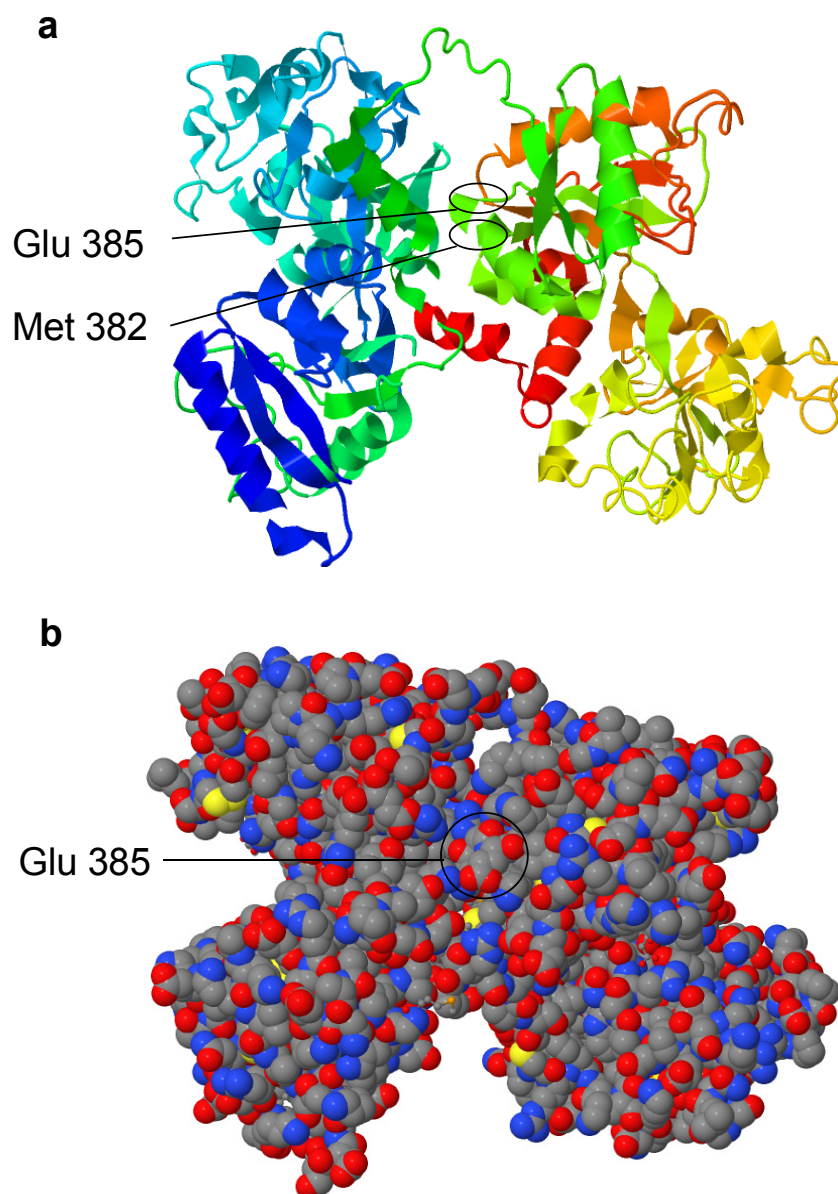


Figure S-11. a) Schematic and b) CPK balls model structures of apo-human serum transferrin, showing the identified cisplatin binding sites. In the CPK model, the atoms color code is the following: C: grey, O: red, N: blue, S: yellow. (Structures retrieved from RSCB Protein Data Bank. ID: 2HAU).

Trabajo 6

“LA-ICP-MS and nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS for the analysis of cisplatin-protein complexes separated by two dimensional gel electrophoresis in biological samples”

Enviado a *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*

Este trabajo fue presentado como Comunicación Oral en la “Winter Conference on Plasma Spectrochemistry” celebrada en Zaragoza (España) en Febrero de 2011

LA-ICP-MS and nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS for the analysis of cisplatin-protein complexes separated by two dimensional gel electrophoresis in biological samples

Journal:	<i>Journal of Analytical Atomic Spectrometry</i>
Manuscript ID:	JA-ART-01-2012-030016.R1
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Moreno-Gordaliza, Estefanía; Universidad Complutense de Madrid, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry</p> <p>Esteban-Fernández, Diego; Humboldt-Universität zu Berlin, Department of Chemistry</p> <p>Giesen, Charlotte; BAM Federal Institute for Materials Research and Testing,</p> <p>Lehmann, Karola; Proteome Factory AG,</p> <p>Lázaro, Alberto; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Department of Nephrology, Renal Physiopathology Laboratory</p> <p>Tejedor, Alberto; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Department of Nephrology, Renal Physiopathology Laboratory</p> <p>Scheler, Christian; Proteome Factory AG,</p> <p>Cañas, Benito; Universidad Complutense de Madrid, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry</p> <p>Jakubowski, Norbert; BAM Federal Institute for Materials Research and Testing,</p> <p>Linscheid, M; Humboldt-Universität zu Berlin, Department of Chemistry</p> <p>Gomez, Milagros; Universidad Complutense de Madrid, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry</p>

LA-ICP-MS and nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS for the analysis of cisplatin-protein complexes separated by two dimensional gel electrophoresis in biological samples

Estefanía Moreno-Gordaliza,^{1*} Diego Esteban-Fernández,² Charlotte Giesen,^{2,3} Karola Lehmann,⁴ Alberto Lázaro,⁵ Alberto Tejedor,⁵ Christian Scheler,⁴ Benito Cañas,¹ Norbert Jakubowski,³ Michael W. Linscheid,² and M. Milagros Gómez-Gómez¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain.

² Humboldt-Universität zu Berlin, Department of Chemistry, Brook-Taylor Str. 2, 12489 Berlin, Germany.

³ BAM Federal Institute for Materials Research & Testing, Richard-Willstätter Str. 11, 12489, Berlin, Germany.

⁴ Proteome Factory AG, Magnus Str. 11, 12489 Berlin, Germany

⁵ Renal Physiopathology Laboratory, Department of Nephrology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Doctor Esquerdo 46, 28007, Madrid, Spain

*Corresponding author: E. Moreno-Gordaliza. E-mail: estefania.moreno@quim.ucm.es, Fax: +34 91 394 43 29, Tel: +34 91 394 52 28.

ABSTRACT

A method for the analysis of Pt-protein complexes in biological samples, previously subjected to cisplatin treatment, has been developed. Proteins were separated by gel electrophoresis, and those bound to Pt detected with high sensitivity by LA-ICP-(SF)-MS. Pt-containing spots were in-gel digested with trypsin and the peptides produced identified using nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS. The influence of protein separation conditions, staining and gel processing prior to laser ablation on Pt-protein bonds preservation have been evaluated using standard proteins incubated with cisplatin. 2-DE separation under non-reducing conditions followed by either coomassie blue brilliant or silver staining is appropriate for Pt-protein complexes, achieving a good separating resolution of the proteins in biological samples. Direct LA-ICP-MS analysis of glycerol-treated dried gels for Pt-protein monitoring resulted in better sensitivity, more reliable relative Pt signals and a simpler and less time-consuming approach compared to the analysis of blotted membranes. Ablation of gels allowed tackling protein identification of Pt-spots in the remaining non-ablated material in the gel, making unnecessary to run several gels in parallel for separate Pt detection and protein identification. By using this approach, Pt coordinated to proteins, such as α -2-macroglobulin, transferrin, albumin or hemoglobin, was detected in the serum from a rat treated *in vivo* with cisplatin after nrSDS-PAGE separation. Furthermore, the first complete LA-ICP-MS metalloprotein contour map in a 2-DE gel has been produced, in this case for the detection of Pt-protein complexes in renal proximal tubule epithelial cells (RPTECs) incubated with cisplatin. Several proteins were identified in those spots containing Pt, which may have a connection with the drug-induced nephrotoxicity mainly affecting this cell type in the kidney.

INTRODUCTION

Cisplatin has been widely used during the past decades for the treatment of solid tumors,¹ its antitumor activity being mainly due to its ability to form complexes with DNA.^{2,3} The main problems related to cisplatin-based therapies are the acquired or developed resistance to the treatment of some tumors and the acute side effects involved, being nephrotoxicity the most problematic and dose-limiting to the treatment.⁴ A significant contribution to these toxic effects might be the ability of Pt to form complexes with proteins,⁵ mainly coordinating to S or N-containing aminoacid

residues. For this reason, and bearing in mind that cisplatin mechanisms of cytotoxicity are not completely understood, efforts have been directed toward the characterization of Pt-protein complexes in the past years.⁶

The study of metal-binding proteins in complex samples requires the use of high resolution separation methodologies as well as sensitive and specific detection techniques to monitor low-abundance species. A common approach in proteomics is the application of gel electrophoresis, a powerful technique for the separation of proteins. Especially high resolution is achieved by two dimensional electrophoresis (2-DE),

III.3. APLICACIONES EN BIOMEDICINA: EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS NEFROPROTECTORAS EN TERAPIAS ANTITUMORALES CON CISPLATINO

Las terapias con cisplatino, cuya efectividad es claramente dosis-dependiente, están limitadas por sus efectos secundarios, entre los cuales la nefrotoxicidad es la complicación más problemática y limitará la dosis administrable. Por este motivo, se plantea como necesidad el desarrollo de estrategias nefroprotectoras que reduzcan la toxicidad renal del fármaco sin producir una merma en su capacidad citostática, y que permitan incrementar la dosis de cisplatino y por tanto la efectividad de los tratamientos. En este contexto, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Tejedor del Laboratorio de Fisiopatología Renal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, bajo la que se efectuaron diversos estudios encaminados a la evaluación de cilastatina como agente nefroprotector en modelos celulares y animales. En este caso, la labor desempeñada en el marco de la colaboración consistió en la determinación de Pt total en muestras de extractos celulares, sueros y extractos de tejidos renales, así como en estudios preliminares de especiación efectuados en las muestras. Con esta colaboración se puso de manifiesto la importancia de la sinergia de la Química Analítica con los campos de la Bioquímica y la Medicina, dando lugar a estudios multidisciplinarios de gran impacto social.

Cilastatina es un inhibidor de la dehidrodipeptidasa I renal (DHP-I) que se desarrolló para su co-administración con el antibiótico imipenem, configurando el fármaco Tienam[®] comercializado por Merck Sharp and Dohme, con el fin de evitar su degradación renal así como de reducir su posible nefrotoxicidad inducida.³⁴⁹ Posteriormente se observó que la administración de Tienam en combinación con otros nefrotóxicos como ciclosporina A en humanos, vancomicina o incluso cisplatino en animales,³⁵⁰ producía una reducción en el daño renal asociado. Recientemente, cilastatina se estudió de manera aislada sobre un modelo de RPTECs y se demostró su efecto reductor del daño y acumulación renales de ciclosporina.³⁵¹ Cilastatina se perfila como un posible protector renal específico debido a su potencial acción exclusiva sobre células provistas de DHP-I, la cual aparece fundamentalmente asociada a la membrana apical de las células de túbulo proximal de riñón, que son las más afectadas por la toxicidad de cisplatino.

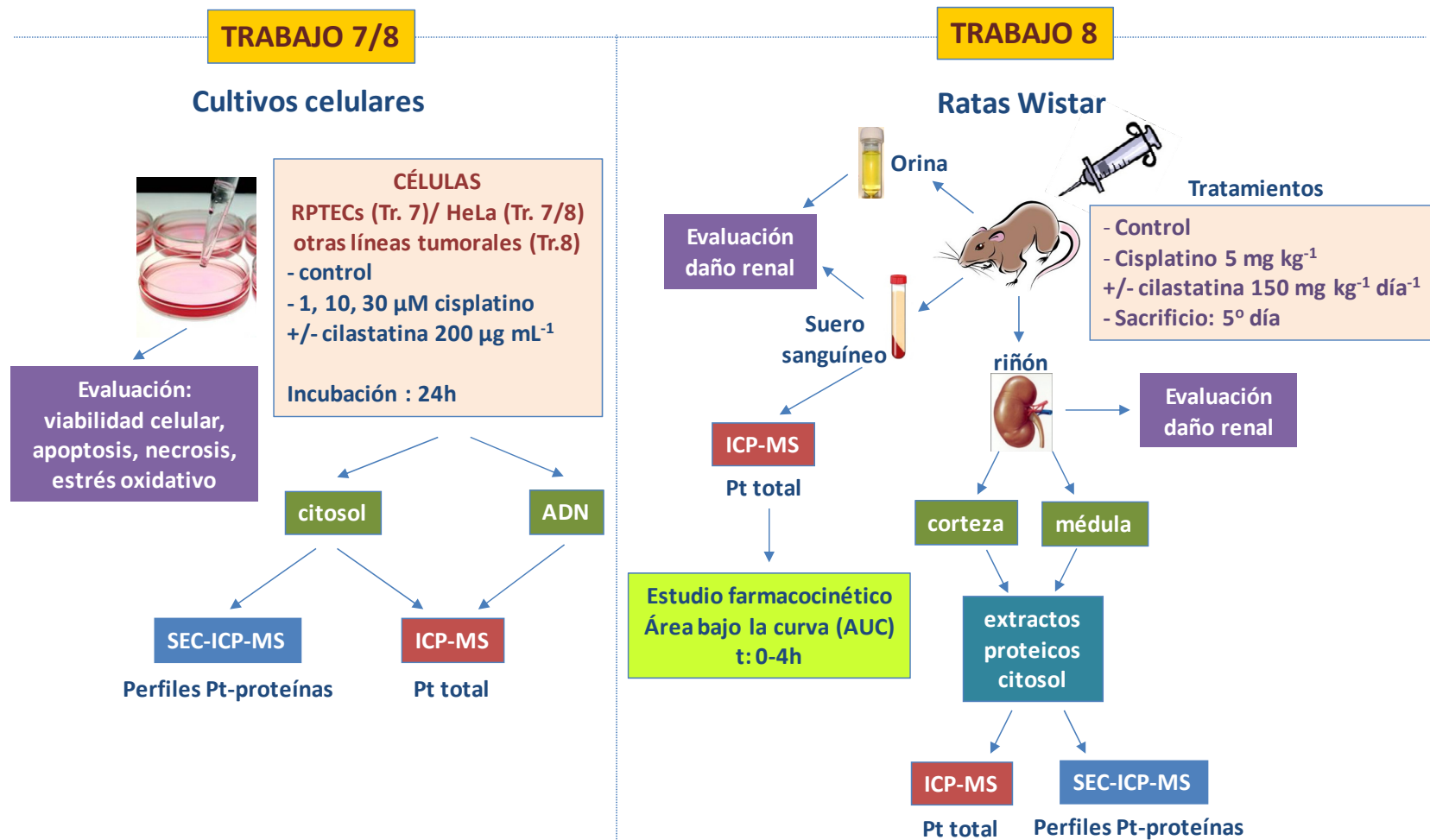
En el Trabajo 7 (**“Cilastatin reduces cisplatin-induced nephrotoxicity”** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2010), 334, 419-429) se planteó la evaluación de cilastatina como nefroprotector sobre un modelo celular de RPTECs expuestas a cisplatino. Para

ello se realizaron estudios *in vitro* a diferentes niveles de concentración de cisplatino (1, 10, 30 μM) durante 24 h. Mediante diferentes ensayos bioquímicos se determinó la influencia de cilastatina sobre la viabilidad celular, y diversos factores de muerte por apoptosis y necrosis, indicadores del daño celular ejercido por el fármaco en RPTECs. Además, se determinó el efecto de cilastatina en la capacidad de entrada de cisplatino en las células y de su unión al ADN, determinando contenidos totales de platino tanto en extractos citosólicos como en la fracción del ADN mediante ICP-MS. Por otro lado, se compararon mediante SEC-ICP-MS los perfiles de proteínas platinadas de los extractos citosólicos de células tratadas con cisplatino y su combinación con cilastatina. Finalmente se estudió el efecto de cilastatina sobre la citotoxicidad de cisplatino en células tumorales humanas HeLa y se contrastaron los niveles de platino unido a ADN en estas células tras dichos tratamientos, que son indicativos del grado de eficacia antitumoral del tratamiento.

A la vista de los prometedores resultados obtenidos en el modelo celular de RPTECs, en el Trabajo 8 (**“Protective effect of cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats”**, aceptado en *Kidney International*, se evaluó la cilastatina como protector de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, en un modelo animal de ratas Wistar. Se estudiaron poblaciones de ratas control y tratadas con cilastatina y/o monodosis de cisplatino a nivel farmacológicamente relevante (5 mg kg^{-1}), y fueron sacrificadas al quinto día del tratamiento, tras el cual es sabido que se ha producido el daño renal. Se determinaron distintos parámetros bioquímicos indicadores de daño renal en suero y orina, diversos factores relacionados con apoptosis, necrosis o estrés oxidativo a nivel renal, y se realizaron estudios histológicos de secciones de riñón, permitiendo estudiar el efecto protector de la cilastatina sobre la toxicidad renal del fármaco. Por otro lado, mediante ICP-MS se determinó la acumulación de platino (relacionada con el daño renal) en extractos citosólicos tanto de corteza como de médula renal, y se evaluó el efecto de cilastatina sobre la farmacocinética del cisplatino en suero sanguíneo, mediante su contenido en platino. Al igual que en el trabajo anterior, mediante SEC-ICP-MS se compararon los perfiles proteicos con Pt, además de los de Cu y Zn, de citosoles de cortezas renales de animales tratados con los compuestos estudiados. Además, se ampliaron los estudios efectuados sobre los efectos del co-tratamiento con cilastatina y cisplatino sobre HeLa y otras cinco líneas celulares tumorales y se determinó mediante ICP-MS los contenidos de Pt en extractos citosólicos de células HeLa tratadas con el fármaco o su combinación con cilastatina.

En el esquema experimental 3 se resumen los ensayos realizados en esta sección.

Esquema experimental 3



Trabajo 7

“Cilastatin reduces cisplatin-induced nephrotoxicity”

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2010), 334, 419-429

Este trabajo fue presentado como Comunicación en formato Póster en la “American Society of Nephrology (ASN) Renal Week 2009” celebrada en San Diego (EEUU) en Octubre de 2009

Cilastatin Attenuates Cisplatin-Induced Proximal Tubular Cell Damage

Sonia Camano, Alberto Lazaro, Estefania Moreno-Gordaliza, Ana M. Torres, Carmen de Lucas, Blanca Humanes, Jose A. Lazaro, M. Milagros Gomez-Gomez, Lisardo Bosca, and Alberto Tejedor

Renal Physiopathology Laboratory, Department of Nephrology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain (S.C., A.L., A.M.T., C.d.L., B.H., J.A.L., A.T.); Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense, Madrid, Spain (E.M.-G., M.M.G.-G.); and Instituto de Investigaciones Biomedicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Madrid, Spain (L.B.)

Received January 8, 2010; accepted April 29, 2010

ABSTRACT

A major area in cancer therapy is the search for protective strategies against cisplatin-induced nephrotoxicity. We investigated the protective effect of cilastatin on cisplatin-induced injury to renal proximal tubular cells. Cilastatin is a specific inhibitor of renal dehydrodipeptidase I (DHP-I), which prevents hydrolysis of imipenem and its accumulation in the proximal tubule. Primary cultures of proximal cells were treated with cisplatin (1–30 μ M) in the presence or absence of cilastatin (200 μ g/ml). Apoptosis and mitochondrial injury were assessed by different techniques. Cisplatin uptake and DNA binding were measured by inductively coupled plasma spectrometry. HeLa cells were used to control the effect of cilastatin on the tumoricidal activity of cisplatin. Cisplatin increased cell death, apoptotic-like morphology, caspase activation, and mitochondrial injury in proximal tu-

bular cells in a dose- and time-dependent way. Concomitant treatment with cilastatin reduced cisplatin-induced changes. Cilastatin also reduced the DNA-bound platinum but did not modify cisplatin-dependent up-regulation of death receptors (Fas) or ligands (tumor necrosis factor α , Fas ligand). In contrast, cilastatin did not show any effects on cisplatin-treated HeLa cells. Renal DHP-I was virtually absent in HeLa cells. Cilastatin attenuates cisplatin-induced cell death in proximal tubular cells without reducing the cytotoxic activity of cisplatin in tumor cells. Our findings suggest that the affinity of cilastatin for renal dipeptidase makes this effect specific for proximal tubular cells and may be related to a reduction in intracellular drug accumulation. Therefore, cilastatin administration might represent a novel strategy in the prevention of cisplatin-induced acute renal injury.

Cisplatin (also known as *cis*-diammine-dichloroplatinum II) is one the most potent antineoplastic drugs used for the treatment of many types of tumors (Boulikas and Vougiouka,

2003). Even though its mechanism of activity has not been clearly established, it is accepted that cisplatin blocks DNA replication and gene transcription by inducing breaks in single- and double-stranded DNA (Servais et al., 2008).

The tumoricidal activity of cisplatin is dose-dependent. In head and neck carcinoma, cisplatin as monotherapy at doses of 100 to 120 mg/mm² every 3 to 4 weeks has a response rate of 19% (Liverpool Head and Neck Oncology Group, 1990). At 200 mg/m², it achieves response rates of 83% in previously untreated patients (Havlin et al., 1989). Nevertheless, cisplatin has potentially lethal adverse effects. The most common is nephrotoxicity (25–40% of treated patients), which limits its use and effectiveness in cancer therapy (Yao et al., 2007).

This work was supported in part by the Fondo de Investigaciones Sanitarias [Grants FIS-PI05/2259, FIS-PI08/1481]; Spanish Ministry of Science and Innovation [Grants CTQ2008-04873/BQU, BFU2008-02161]; Comunidad de Madrid [Grant CIFRA 0283/2006]; and Fundacion Mutua Madrilenia [Grant TJ2BS].

S.C. and A.L. are recipients of a healthcare research contract from Comunidad de Madrid and Fondo de Investigaciones Sanitarias ("Sara Borrell"), respectively.

S.C. and A.L. contributed equally to this work.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.

doi:10.1124/jpet.110.165779.

ABBREVIATIONS: RPTECs, renal proximal tubular epithelial cells; OCT, organic cation transporter; DHP-I, dehydrodipeptidase I; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; FITC, fluorescein isothiocyanate; LDH, lactate dehydrogenase; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; $\Delta\psi_m$, mitochondrial transmembrane potential; CCCP, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; ICP/MS, inductively coupled plasma/mass spectrometry; SEC, size exclusion; TNF, tumor necrosis factor; Fas-L, Fas ligand; PCR, polymerase chain reaction; RPLPO, ribosomal phosphoprotein large PO subunit; ANOVA, analysis of variance; CFUs, colony-forming units; Pt, platinum; Ir, iridium.

The glomerular filtration rate can decrease by 30% after only two doses, and treatments must often be stopped (Go and Adjei, 1999). In fact, only 60% of patients complete three of four cisplatin cycles.

Cisplatin-induced nephrotoxicity involves enhanced oxidative stress, inflammatory reactions, and tubular cell apoptosis (Lieberthal et al., 1996; Yao et al., 2007; Pabla and Dong, 2008). Several pathways—including extrinsic and intrinsic pathways and the endoplasmic reticulum—are involved in proximal tubular apoptosis (Pabla and Dong, 2008). Several studies have shown that cisplatin directly activates proapoptotic Bcl-2 family proteins such as Bax and Bak in cultured tubular cells and in vivo (Park et al., 2002; Wei et al., 2007), thus leading to mitochondrial permeability transition, release of cytochrome *c*, and activation of caspase 9, which finally activates caspase 3, the principal enzyme responsible for apoptosis of renal tubular cells.

Although several in vitro and in vivo approaches have been proposed to reduce cisplatin-induced nephrotoxicity (Nagothu et al., 2005; Wu et al., 2005; Jiang et al., 2007; Lee et al., 2009), the protection they provide is never complete, thus highlighting the need for combined strategies. However, it is unclear whether such approaches would limit the tumoricidal efficacy of cisplatin in cancer cells. We took advantage of the way in which cisplatin is excreted by the kidney to design a strategy specifically aimed at inhibiting apical uptake of cisplatin by renal proximal tubular epithelial cells (RPTECs), without affecting its accumulation and effectiveness in other cells.

Although cisplatin is a substrate of organic cation transporter (OCT) 2 in the basolateral membrane of the proximal tubules, 60% of cisplatin administered is recovered from lysosomes on the apical membrane, indicating a major role of vesicle cycling in accumulation in RPTECs (Binks and Dobrota, 1989). The relative importance of the roles of the apical and basolateral pathways for the entry of cisplatin into proximal cells can be deduced by analyzing data from the nonfiltering kidney (Binks and Dobrota, 1989).

The apical pole of RPTECs contains proteins found only at this location and which are probably involved in apical vesicle trafficking and extrinsic signal transduction. Inhibition of renal dehydrodipeptidase I (DHP-I), which is located on brush-border cholesterol rafts (Parkin et al., 2001), effectively reduces toxic intracellular accumulation of imipenem (Norrby et al., 1983), cyclosporine A, and tacrolimus (Pérez et al., 2004; Tejedor et al., 2007), and provides specific RPTECs protection against apoptosis induced by these agents. In the present study, we show that cilastatin, a specific inhibitor of brush border-bound renal DHP-I, can provide organ-specific protection against cisplatin-induced nephrotoxicity.

Materials and Methods

Chemicals

Cisplatin was obtained from Pharmacia (Barcelona, Spain). Crystalline cilastatin (provided by Merck Sharp and Dohme S.A., Madrid, Spain) was dissolved in cell culture medium at the specified concentrations. A dose of 200 $\mu\text{g/ml}$ was chosen because it is cytoprotective and falls within the reference range for clinical use (Pérez et al., 2004).

Proximal Tubular Primary Cell Culture and HeLa Cell Line Culture

Porcine RPTECs were obtained as described previously (Pérez et al., 2004). In brief, the cortex was sliced and incubated for 30 min at 37°C with 0.6 mg/ml collagenase A (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Penberg, Germany) in Ham's F-12 medium. Digested tissue was then filtered through a metal mesh (250 μm), washed three times with Ham's F-12 medium, and centrifuged using an isotonic Percoll gradient (45%; v/v) at 20,000g for 30 min. Proximal tubules were recovered from the deepest fraction, washed, and resuspended in supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 medium in a 1:1 ratio (with 25 mM HEPES, 3.7 mg/ml sodium bicarbonate, 2.5 mM glutamine, 1% nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 5×10^{-8} M hydrocortisone, 5 mg/ml insulin-transferrin-sodium selenite media supplement, and 2% fetal bovine serum). Proximal tubules were seeded at a density of 0.66 mg/ml and incubated at 37°C in a 95% air/5% CO₂ atmosphere. Culture medium was renewed every 2 days. RPTECs were used after they had reached confluence (80%). HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin in a humidified environment with 95% air/5% CO₂ at 37°C.

Cell Death Studies

Cell Morphology. To detect evidence of apoptosis, cell morphology was observed using phase-contrast microscopy. Cell nuclei were visualized after DNA staining with the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). In brief, cells were seeded on coverslips in a 24-well plate, fixed in 4% formaldehyde for 10 min, and permeabilized with 0.5% Triton X-100. Cells were then rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), incubated with DAPI (12.5 $\mu\text{g/ml}$) for 15 min, and excess dye was removed. Cell imaging was performed with the 40 \times PL-APO (apochromatic and flat field correction) 1.25-numerical aperture oil objective of a Leica-SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). DAPI was excited with a 405-nm laser diode. Emission between 420 and 490 nm was collected following Leica recommendations. Six fields with ~ 200 cells/field were examined in each condition to estimate the percentage of nuclei with apoptosis-like appearance.

Propidium Iodide Flow Cytometry and Cell Detachment Quantification. RPTECs were cultured with 30 μM cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. Nonadherent and adherent cells were harvested separately, and both cell populations were resuspended in 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min at 4°C. Cells were washed with PBS, permeabilized with PBS/Tween 0.5% for 15 min at room temperature, and incubated with 250 $\mu\text{g/ml}$ RNase and 40 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) for 45 min at room temperature (Pérez et al., 2004). Assay samples were analyzed by flow cytometry with a FACScan equipped with a single argon ion laser (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using standard Lysis II software (Becton Dickinson). Detached cells were quantified by flow cytometry (FACScan). Side scatter, forward scatter, and FL2 fluorescence were collected. FL2-A and FL2-W were used to identify and exclude doublets from the analysis.

Nucleosomal Quantification. To evaluate DNA fragmentation in the context of apoptosis, RPTECs were incubated under specific conditions for 24 h. At the end of this period RPTECs were lysed and centrifuged at 200g for 10 min to remove cell debris. DNA and histones present in the soluble fraction were quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay cell death kit (Boehringer Mannheim). Histone and DNA present in mononucleosomes and oligonucleosomes in the cytoplasmic fraction of cell lysates were detected by a sandwich enzyme immunoassay with antihistone and anti-DNA-peroxidase antibodies as described previously (Pérez et al., 2004).

Caspase Activity Assay. Caspase 3, caspase 8, and caspase 9 activities were determined using the substrates DEVD-pNA, IETD-pNA, and LEHD-pNA, respectively, following the protocols of the

APOPCYTO Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 Colorimetric Assay Kits from MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (Nagoya, Japan). At 24 or 48 h of treatment, both adherent and nonadherent cells were harvested, resuspended in 120 μ l of lysis buffer (MBL Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), and incubated at 4°C for 10 min followed by centrifugation at 10,000g for 5 min. Aliquots (50 μ l) of supernatants were removed and placed in a 96-well microplate. Substrate was added, and the microplate was incubated at 37°C for 2 h. pNA light absorption was quantified using a spectrophotometer plate reader at 405 nm and compared with a linear standard curve generated on the same microplate.

Measurement of Annexin V/Fluorescein Isothiocyanate Staining. Annexin staining was determined using confocal microscopy. RPTECs were treated for 12, 24, or 48 h with 30 μ M cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 μ g/ml). Both adherent and nonadherent cells were collected and centrifuged at 1500 rpm for 5 min, rinsed twice with binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl_2), resuspended at a final density of 1 to 2×10^6 cells/ml, and incubated with 5 μ l of annexin V/fluorescein isothiocyanate (FITC) (Biotium, Hayward, CA) for 15 min at room temperature in the dark. Next, cells were fixed in 2% formaldehyde for 15 min at room temperature, washed, and placed on a glass coverslip to be visualized. Microscopy was performed using a Leica-SP2 confocal microscope (Leica Microsystems). Different measurements of annexin V/FITC fluorescence were assessed with Leica Confocal Software LCS-1537 (Leica Microsystems).

Determination of Lactate Dehydrogenase Release. Lactate dehydrogenase (LDH) release from RPTECs was measured in the culture media after treatment with cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 μ g/ml) for 24 and 48 h. LDH was measured automatically in a modular AutoAnalyzer Cobas 711 (Roche, Basel, Switzerland). LDH release was expressed in relative terms to total LDH released by treatment with 0.1% Triton X-100 (100% release).

Cell Viability Assay. Cell survival assay relies on the capacity of cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) (Calbiochem, San Diego, CA) to colored formazan in metabolically active cells. RPTECs or HeLa cells were seeded and incubated with cisplatin alone or in combination with cilastatin. Twenty-four, 48, or 72 h later, 0.5 mg/ml MTT was added, and plates were incubated for 3 h in the dark at 37°C, and 100 μ l of 50% dimethyl formamide in 20% SDS, pH 4.7, was added. Plates were incubated at 37°C overnight, and absorbance was measured at 595 nm. All the assays were performed in triplicate.

Cell Viability: Quantification of Colony-Forming Units

RPTECs were treated for 24 h with cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 μ g/ml). Adherent cells were washed in saline serum, harvested with trypsin/EDTA, seeded in Petri dishes (100 mm), and cultured for 7 days in drug-free complete medium. Surviving adherent cells were fixed for 5 min with 5% paraformaldehyde/PBS and stained with 0.5% crystal violet/20% methanol for 2 min. Excess dye was rinsed with PBS. Finally, the intracellular dye was eluted with 50% ethanol/50% sodium citrate 0.1 M, pH 4.2, and quantified by spectrometry at 595 nm.

Mitochondrial Membrane Potential Assay

Changes in mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) were measured using the MitoProbe JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. JC-1 is a cationic dye that exhibits potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green (~ 529 nm) to red (~ 590 nm). Consequently, mitochondrial depolarization is seen as a shift to lower JC-1 red fluorescence accompanied by an increase in JC-1 green fluorescence.

Data analyses were performed using WinMDI software (<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/software/winmdi.htm>) by measuring both the green (530 ± 15 nm) and red (585 ± 21 nm) JC-1 fluores-

cence with an FACScan equipped with a single argon ion laser (Becton Dickinson). At least 10,000 events were acquired per sample. The membrane potential disruptor, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazide (CCCP; supplied with the kit, 50 μ M final concentration), was used as a positive control.

Cytochrome c Release

Release of cytochrome c from mitochondria into cytosol was measured using Western blot analysis. RPTECs treated for 24 h with 10 to 30 μ M cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 μ g/ml) were harvested, washed once with ice-cold PBS, and gently lysed for 10 min in ice with 90 μ l of lysis buffer (250 mM sucrose, 80 mM KCl, 500 μ g/ml digitonin, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors in PBS). Cell lysates were centrifuged at 12,000g at 4°C for 5 min to obtain the supernatants (cytosolic extract free of mitochondria) and the pellets (fractions containing the mitochondria), which were resuspended in 90 μ l of lysis buffer. Equal amounts of protein were loaded (50 μ g in each lane) and electrophoresed on 15% polyacrylamide gels as described previously (Gallego-Delgado et al., 2006).

Goat polyclonal antibody against C terminus of cytochrome c of human origin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) was used at 1:500. The membranes were also probed with goat polyclonal antibody against a peptide of voltage-dependent anion-selective channel 1 of human origin (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for mitochondrial fractions and monoclonal anti- α -tubulin Clone B-5-1-2 Mouse Ascites Fluid (mouse IgG1 isotype) antibodies (1:10,000; Sigma-Aldrich) for cytosolic fractions as internal controls for the technique. Proteins were visualized with the enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Cellular Cisplatin Uptake and Estimation of DNA-Bound Platinum. Platinum-Biomolecule Speciation Analysis

RPTECs incubated for 24 h with increasing concentrations of cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 μ g/ml) were scraped and lysed in 400 μ l of lysis buffer at 70°C [2.22% (w/v) SDS; 19.33% (v/v) glycerol (87% v/v); 790 mM Tris HCl, pH 6.8, in dH_2O , phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors]. Cell lysates were heated at 100°C for 5 min, homogenized in ice, and centrifuged at 12,000g for 5 min at 4°C. The supernatant was analyzed for total protein content and cisplatin (as platinum, Pt). Alternatively, for DNA/Pt measurements, RPTECs and HeLa cells were treated for 24 h with cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 μ g/ml), and both nonadherent cells and adherent cells were collected, rinsed with PBS, and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. Cell pellet was resuspended in PBS/lysis buffer (v/v, 20 mM EDTA, pH 8, 0.5% Triton X-100, and 5 mM Tris, pH 8) and incubated 30 min at 37°C with 10 mg/ml RNase A (Invitrogen). Samples were then treated with proteinase K (10 mg/ml; Applied Biosystems, Foster City, CA) at 55°C for 3 h and then extracted with phenol (equilibrated with Tris, pH 8.0; Sigma-Aldrich) by shaking gently for 2 min. After centrifugation (12,000 rpm), the phases were separated, and the aqueous phase was isolated. The extraction was repeated twice with phenol-chloroform/isoamyl alcohol (1–24:1, v/v) and finally with chloroform/isoamyl alcohol (24:1, v/v). The DNA in the aqueous phase was precipitated by the addition of 100% ethanol at -20°C and 3 M sodium acetate, pH 5.3, followed by incubation overnight at -80°C . The DNA was collected by centrifugation (12,000 rpm, 15 min), washed with 1 ml of 70% ethanol, dried, and resuspended in 300 μ l of 10 mM Tris, pH 7.6, and 0.1 mM EDTA in sterile water. The DNA was quantitatively estimated from the absorption at 260 nm using a NanoDrop UV-visible instrument (Nucliber, Madrid, Spain).

Pt content in cell-soluble fraction or DNA was measured using a Quadrupole Thermo X-series inductively coupled plasma/mass spectrometry (ICP/MS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) equipped with a Meinhard nebulizer (Meinhard Glass Products,

Golden, CO), a Fassel torch, and an Impact Bead Quartz spray chamber (both by Glass Expansion, West Melbourne, VIC, Australia) cooled by a Peltier system (Peltier Systems, LLC, Athens, TX). Before the analysis, samples were 5-fold diluted in aqueous solutions containing 2% HCl, which made it possible to stabilize Pt. Quantification was performed by external calibration; the internal standard was iridium (Ir), added in a final concentration of 20 $\mu\text{g/l}$ to both samples and standards. ICP/MS measurements were acquired in continuous mode, monitoring m/z ^{194}Pt , ^{195}Pt , and ^{191}Ir , and results were expressed as (microgram Pt/gram protein) and (microgram Pt/gram DNA).

Pt-Biomolecule Speciation Analysis. Pt-biomolecules were analyzed by high-performance liquid chromatography/ICP/MS. Supernatants were chromatographically separated using a size exclusion (SEC) Superdex 75 10/300 GL column (Amersham), which presents a nominal separation between 3 and 70 kDa. Ten millimolar Tris- NO_3 and 25 mM NaCl, pH 7.42, was used as the mobile phase at a flow rate of 0.8 ml/min. The SEC column was coupled to an ICP/MS, and ^{195}Pt was monitored. Samples were 1:1 diluted with the mobile phase before analysis, and 100 μl of each sample was injected into the chromatographic system through a 0.22- μm nylon filter. In parallel, the SEC column was calibrated using several proteins with different molecular masses: blue dextran (>2000 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome *c* (12.4 kDa), and aprotinin (6.5 kDa) (Sigma-Aldrich), with a UV-visible detector. These molecular masses can be used as a reference for the separation capacity of the column, although it should be borne in mind that secondary interactions with the stationary phase could alter retention times.

DHP-I and DHP-IV Activity Assays

RPTECs or HeLa cells were incubated overnight with Gly-Phe-*p*-nitroanilide (DHP-I substrate; Sigma-Aldrich) 1 mM in PBS for DHP-I activity determination, or with Gly-Pro-*p*-nitroanilide (DHP-IV substrate; Sigma-Aldrich) 1 mM for DHP-IV activity determination. Both activities were measured in the presence or absence of cilastatin (200 $\mu\text{g/ml}$). *p*-Nitroanilide was quantified in aliquots from supernatants by measuring 410-nm absorbance.

Cisplatin-Induced Expression of Apoptotic Genes in RPTECs

Tumor necrosis factor (TNF) α , Fas, and Fas ligand (Fas-L) gene expression was analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR). RPTECs were cultured with 30 μM cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. Total RNA was isolated by the TRIzol method (Invitrogen) from RPTECs and processed according to the protocol provided by the manufacturer. In brief, 1 μg of RNA was reverse-transcribed with High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed on a TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using heat-activated Taq DNA polymerase (Amplitaq Gold) (Lazaro et al., 2005). For all the quantitative cDNA analyses, the ΔCT technique was applied (Lazaro et al., 2005). Ribosomal phosphoprotein large PO subunit (RPLPO) served as housekeeping gene and was amplified in parallel with the genes of interest. The expression of each target gene was normalized to RPLPO. Primer sequences for porcine TNF α , Fas, Fas-L, and RPLPO were synthesized commercially (Invitrogen) and are available on request. All the measurements were performed in duplicate. Controls consisting of ddH₂O were negative in all the runs.

Immunofluorescence Localization of Fas-L

RPTECs grown on sterile crystal coverslips were treated with 30 μM cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 $\mu\text{g/ml}$) for 0.5 and 2 h. Cells were washed with PBS and fixed in 4% formaldehyde in PBS for 10 min. Cells were washed twice in PBS and blocked for 1 h in bovine serum albumin 1%/PBS/Tween 0.1% at 37°C. Cells then were incubated with rabbit polyclonal antibody

against a peptide of C terminus of Fas-L of human origin (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 1 h at 37°C followed by incubation with FITC-conjugated secondary antibody (donkey anti-rabbit, 1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) in blocking solution for another hour at 37°C. Cell nuclei were counterstained with DAPI (5 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich). The absence of primary antibody was the negative control. After washing, cells were mounted in fluorescent mounting medium (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA), and Fas-L immunolocalization was examined with the 20 \times PL-APO 0.7-numerical aperture objective of a Leica-SP2 confocal microscope (Leica Microsystems). Different intensity measurements were assessed with the Leica Confocal Software LCS-1537 (Leica Microsystems).

Statistical Methods

Quantitative variables were summarized as the mean \pm S.E.M. Differences were considered statistically significant for bilateral α values less than 0.05. Factorial analysis of variance (ANOVA) was used when more than one factor was considered. When a single factor presented more than two levels, a post hoc analysis (least significant difference) was performed if the model showed significant differences between factors. When demonstrative results are shown, they represent a minimum of at least three repeats. When possible, a quantification technique (e.g., densitometry, dye recovery) has been used to illustrate reproducibility.

Results

Cilastatin Reduces Cisplatin-Induced Proximal Tubular Cell Death. Cisplatin induces time- and dose-dependent cell death on primary culture of RPTECs. When RPTECs are exposed to increasing concentrations of cisplatin for 3, 6, 24, and 48 h, direct observation by phase microscopy shows cell rounding and detachment from the plate. Cilastatin significantly reduced the observed impact for every cisplatin concentration and exposure time studied (Fig. 1A).

However, cisplatin-induced cell death causes an early detachment of damaged cells from the plate. We studied the characteristics of nonadherent cells in terms of size, complexity, and PI staining by flow cytometry after 24-h exposure to increasing doses of cisplatin \pm cilastatin. Figure 1B shows the flow cytometry histogram for PI staining (FL2-H) of nonadherent cells from control plates, 30 μM cisplatin-treated plates, or 30 μM cisplatin plus cilastatin-treated plates. A relevant span of PI fluorescence was observed because both diploid and hypodiploid populations are recovered in the supernatant. Figure 1C is a quantification of these nonadherent cells. Cilastatin caused a 70% reduction in cell detachment when 30 μM cisplatin was used. Cell protection becomes statistically significant at cisplatin concentrations greater than 10 μM .

Qualitative estimation of apoptotic cell death was obtained in adherent cells stained with DAPI (Fig. 1D). Incubation with 30 μM cisplatin led to cell shrinkage with significant nuclear condensation, fragmentation, and formation of apoptotic-like bodies (see arrows). Figure 1E shows a quantification of apoptotic nuclei in adherent cells. Cilastatin reduced nuclear damage by 64%.

We quantified the functional impact of cisplatin treatment on cell survival by measuring the percentage of adherent cells still able to reduce MTT to formazan after exposure to increasing doses of cisplatin. Coincubation with cilastatin

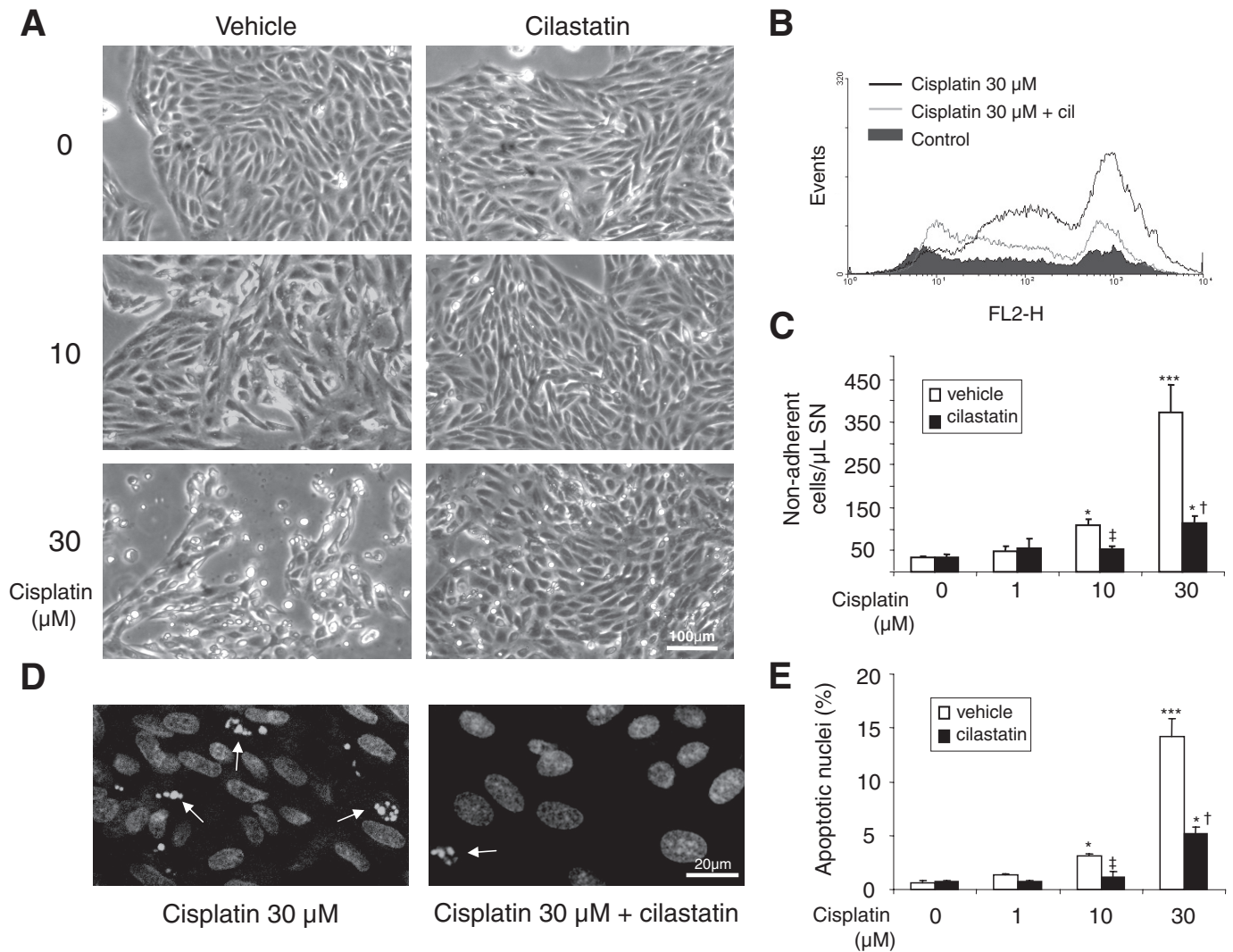


Fig. 1. Effects of cilastatin on RPTECs morphology during treatment with cisplatin. RPTECs were cultured in the presence of cisplatin (1, 10, and 30 μM) and cisplatin + cilastatin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. A, phase-contrast photomicrographs are shown (representative example of at least three independent experiments; original magnification, 40 \times). B, flow cytometry analysis: nonadherent cells were harvested, fixed, and stained with PI for DNA content. FL2-H signal is presented for the three studied conditions. C, the effect of cilastatin on cisplatin-induced detachment of RPTECs was measured by flow cytometry and determined by counting the number of cells in an equal volume of buffer. D, nuclear staining with DAPI. Adherent RPTECs treated with 30 μM cisplatin and 30 μM cisplatin + 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin were stained with DAPI to study whether apoptotic-like nuclear morphology was present. Arrows point to fragmented, apoptotic nuclei. E, quantitative approach to the images presented in D. Data are represented as the mean \pm S.E.M. of at least three separate experiments. ANOVA models, $P < 0.0001$. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0001$ versus control; \dagger , $P < 0.05$; \ddagger , $P < 0.0001$ versus same data without cilastatin.

doubles cell survival in every condition analyzed. Statistical significance was obtained for incubations with cilastatin in 10 μM cisplatin and more than 24 h (Fig. 2A).

Analysis of nucleosomal DNA fragmentation and migration from nuclei to cytosol is presented in Fig. 2B. RPTECs exposed to cisplatin for 24 h present a dose-dependent increase in nucleosomes recovered from cytosol, which were reduced by cilastatin treatment.

To better characterize the apoptosis process triggered on RPTECs by cisplatin, we quantified annexin V/FITC staining and caspase 3, caspase 8, and caspase 9 activation. Cisplatin caused an increase in annexin V/FITC staining that reached a maximum at 24 h and persisted until 48 h (Fig. 2C). Confocal microscopy showed that annexin V was mainly localized to the outer leaflet of the plasma membrane (data not shown). Cilastatin coincubation showed less annexin V staining, with a reduction of 53% (Fig. 2C).

Because apoptosis is generally followed by secondary necrosis, which is associated with the leakage of plasma membrane, we also measured the release of LDH from the cells in the medium (Fig. 2D). At 24 h, 30 μM cisplatin incubation caused 6% release of total LDH cellular content (as estimated from Triton X-100 treatment). This percentage increased to 30% at 48 h. Necrotic cell death was not modified by cilastatin coincubation, indicating that cilastatin reduction of cisplatin-induced cell death was specific for apoptosis. Cisplatin-induced apoptosis was further confirmed by caspase 9, caspase 8, and caspase 3 activities. Figure 3, A through C, shows that increasing doses of cisplatin caused significant activation of caspase 8 and caspase 3, with caspase 9 less evident. Cilastatin reduced caspase 8 and caspase 3 activations at 24 and 48 h (for caspase 3, Fig. 3D). Cilastatin alone had no effect on any of the previously reported data.

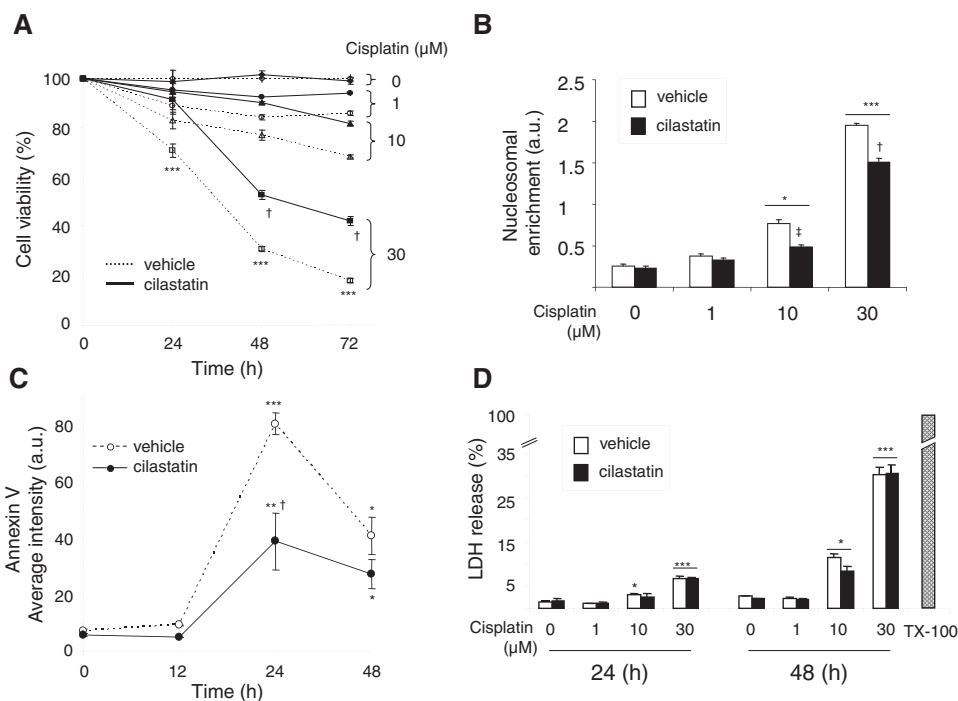


Fig. 2. Cilastatin attenuates cisplatin-induced apoptosis but not necrosis. RPTECs were exposed to cisplatin (1, 10, and 30 μ M) and cisplatin + cilastatin (200 μ g/ml) for indicated times. A, effect of cilastatin on cisplatin-induced loss of cell viability determined by the ability to reduce MTT (see *Materials and Methods*). Results are expressed as the percentage of the value obtained relative to control (without cisplatin and cilastatin). ANOVA model, $P < 0.0001$; cisplatin dose, $P < 0.0001$; cilastatin effect, $P < 0.0001$; time effect, $P < 0.0001$; cilastatin \times time, N.S. *** $P < 0.0001$ all the data versus control (except 30 μ M + cilastatin, 10 μ M + cilastatin, and 1 μ M + cilastatin at 24 h; $P =$ N.S.); †, $P < 0.0001$ every condition + cilastatin versus same condition without cilastatin (except 10 μ M + cilastatin and 30 μ M + cilastatin at 24 h; $P < 0.05$). B, oligonucleosomes at 24 h were quantified in the cell-soluble fraction and detected with an enzyme-linked immunosorbent assay kit. C, phosphatidylserine externalization was determined in nonadherent cells by annexin V/FITC staining and confocal microscopy quantification. D, effect of cilastatin in cisplatin-induced LDH release. Data are presented as percentage of total LDH release obtained by Triton X-100 cell treatment. Data are represented as the mean \pm S.E.M. of at least three separate experiments. ANOVA models, $P < 0.0001$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$ versus control; †, $P < 0.05$; ‡, $P < 0.0001$ versus same data without cilastatin.

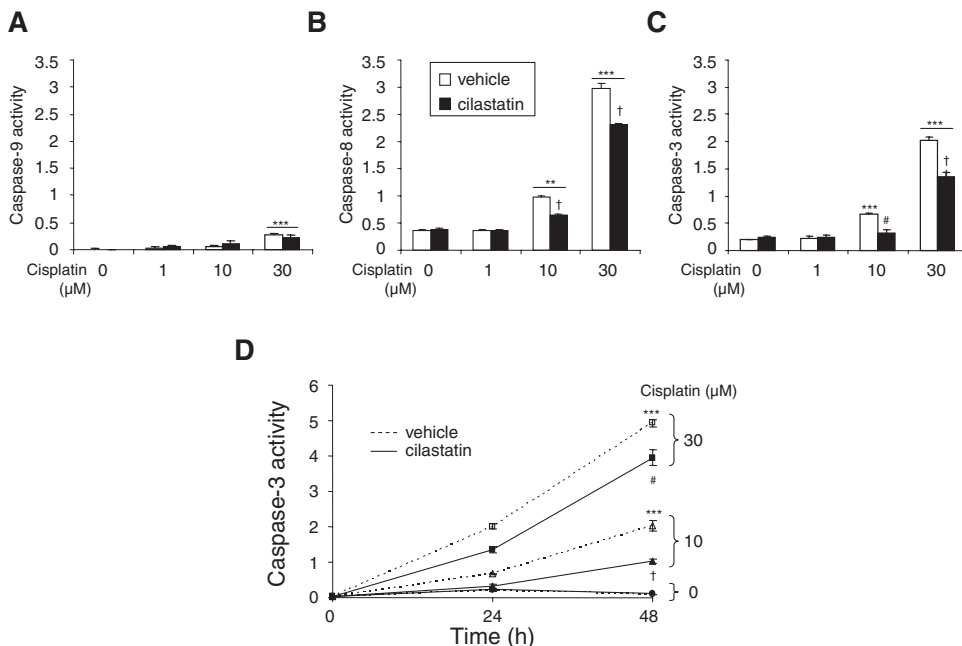


Fig. 3. Effect of cisplatin and cilastatin on caspase activity. A, B, and C show the activation of caspase 9, caspase 8, and caspase 3, respectively, with increasing doses of cisplatin for 24 h, as well as the effect of cilastatin (200 μ g/ml). ANOVA model, $P < 0.0001$. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$ versus control; #, $P < 0.01$; †, $P < 0.0001$ versus same data without cilastatin. D, time course activation of caspase 3 with different doses of cisplatin \pm 200 μ g/ml cilastatin. Data are represented as the mean \pm S.E.M. of four experiments. ANOVA model, $P < 0.0001$; cisplatin dose, $P < 0.0001$; cilastatin effect, $P < 0.0001$; cilastatin \times cisplatin, $P < 0.0001$. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$ versus control; #, $P < 0.01$; †, $P < 0.0001$ versus same data without cilastatin.

Cilastatin Reduces Cisplatin-Induced Mitochondrial Damage. Mitochondrial damage is a central event in the cytotoxic and nephrotoxic activity of cisplatin. Comparison of control cells with cisplatin-treated RPTECs showed ev-

ident membrane depolarization (decrease in red fluorescence; FL2-H) with no changes in green fluorescence (FL1-H) (Fig. 4A). Cilastatin alone did not have a significant effect on $\Delta\psi$ m. However, cilastatin partially pre-

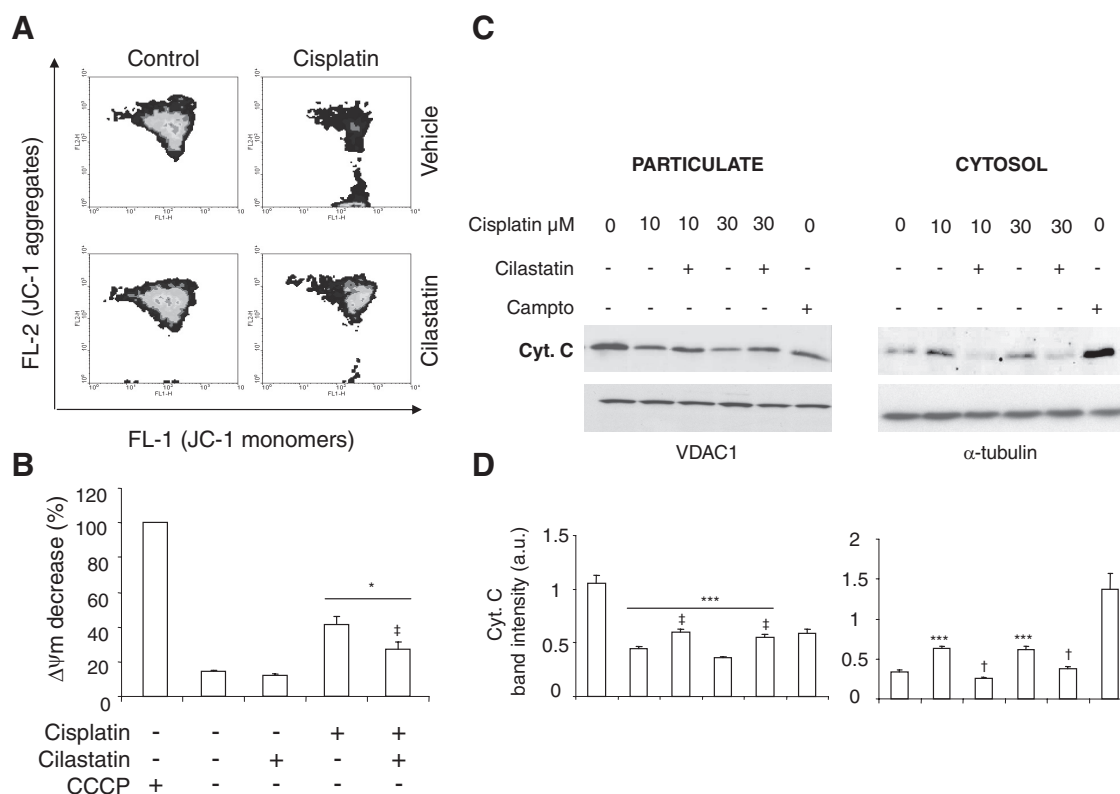


Fig. 4. Effect of cilastatin on cisplatin-induced mitochondrial injury. A, changes in $\Delta\Psi_m$ were analyzed by flow cytometry after staining with JC-1. RPTECs were incubated with 30 μM cisplatin with or without 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin for 24 h. Results are presented as contour plots. B, quantification of the results of four independent experiments. As a positive control, cells were treated for 5 min with 50 μM CCCP. Decrease in red fluorescence with CCCP was considered as 100% of the change in $\Delta\Psi_m$. Data are the mean \pm S.E.M. ANOVA model, $P < 0.0001$. *, $P < 0.05$ versus control; ‡, $P < 0.05$ versus same data without cilastatin. C, Western blot analysis of cytochrome *c* of cytosolic and mitochondrial fractions of RPTECs treated with 10 and 30 μM cisplatin in the presence or absence of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin for 24 h. Voltage-dependent anion-selective channel and α -tubulin antibodies were used as internal loading controls for mitochondrial (particulate) and cytosolic fractions, respectively. Camptothecin (Campto), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, was used as a positive control. D, the values corresponding to normalized cytochrome *c* band intensity. Mean \pm S.E.M. of three separate experiments. ANOVA model, $P < 0.0001$. ***, $P < 0.0001$ compared with control group; ‡, $P < 0.05$; †, $P < 0.0001$ versus same data without cilastatin.

vented $\Delta\Psi_m$ loss when RPTECs were simultaneously exposed to cisplatin and cilastatin. The results were quantified and expressed in relative terms compared with total depolarization induced by CCCP (Fig. 4B).

To further investigate the role of the mitochondria in cilastatin-mediated effect, cisplatin action with and without cilastatin on cytochrome *c* release was studied. As presented in Fig. 4C, the subcellular distribution of cytochrome *c* between mitochondria (particulate) and cytosol reveals a significant degree of protection, indicating that cilastatin improves the cell viability of RPTECs (Fig. 4, C and D).

Cilastatin Improves Long-Term Recovery and Cell Viability in RPTECs after Exposure to Cisplatin. To know the long-term viability of surviving RPTECs after 24-h exposure to cisplatin, we tested the ability of those cells to proliferate into new cell colonies. Colony-forming units (CFUs) were quantified as specified under *Materials and Methods*. The CFU count decreased dramatically after 24 h of treatment with cisplatin, and this decrease was clearly dose-dependent (Fig. 5A). When RPTECs were exposed to cisplatin and cilastatin simultaneously, the number of CFUs was significantly greater after 7 days of recovery at every cisplatin concentration studied. The intracellular dye was extracted, and absorbance was quantified at 595 nm (Fig. 5B).

Cilastatin Reduces Intracellular Accumulation of Cisplatin. Effects in DNA-Bound Pt. The nephrotoxicity

of cisplatin largely depends on the intracellular concentration reached, more specifically on the DNA-bound Pt. Dose-dependent cisplatin accumulation was measured in the soluble fraction of RPTECs after 24-h incubation (Fig. 6A). Because of the early cell detachment detected previously, we decided also to quantify DNA-bound Pt in adherent cells and nonadherent cells after 24-h incubation with 30 μM cisplatin (Fig. 6B). Cilastatin caused a significant reduction (24%) in Pt recovered from cell-soluble fraction, but the effect was much more relevant when DNA-bound Pt was analyzed in the presence of cilastatin; DNA-bound Pt was reduced by 55% in adherent cells and by 44% in nonadherent cells.

Speciation studies were performed by SEC/ICP/MS on RPTECs. As Fig. 6C shows, there is no change in the profile of Pt-containing proteins irrespective of whether cells are treated with cilastatin. Pt-bound proteins were observed within the whole separation range (3–70 kDa), and the most intense peaks corresponded to species around 70 and 7 kDa. Moreover, no significant peaks were observed for intact cisplatin or the intracellular monoquo complex, which elute at 47.3 and 30.6 min, respectively, indicating that all Pt is bound to biomolecules (Fig. 6C).

Cell Type Specificity of Cilastatin Protection: The Case of HeLa Cells. To evaluate the potential loss of the tumoricidal effect of cisplatin caused by the presence of cilastatin, we applied cisplatin to a tumor-derived cell line. When

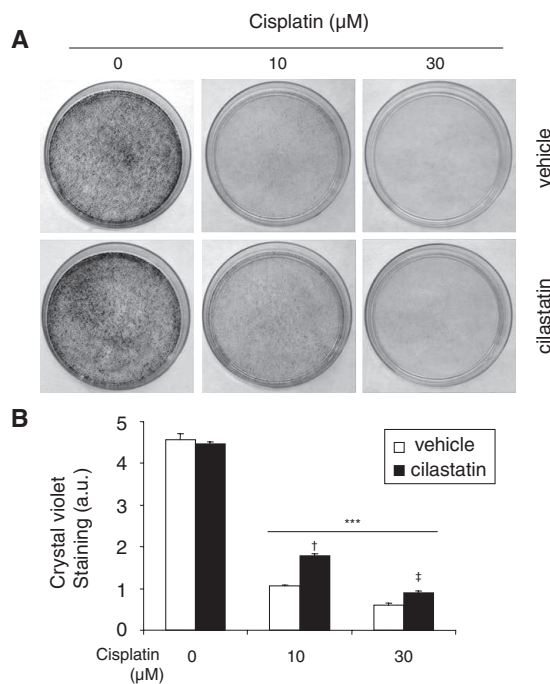


Fig. 5. Cilastatin preserves long-term recovery of cisplatin-treated RPTECs. **A**, RPTECs plated on six-well plates were incubated with 10 and 30 μM cisplatin in the presence or absence of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin for 24 h. Cells were then trypsinized, washed, and seeded in Petri dishes in the presence of complete medium with 10% fetal bovine serum, but without cisplatin or cilastatin, to allow for recovery. The number of CFUs was determined by staining with crystal violet after 7 days. Cilastatin increased the number of long-term surviving cell colonies. The photographs represent three different experiments. **B**, quantification of crystal violet staining. Mean \pm S.E.M. of three experiments. ANOVA model, $P < 0.0001$. ***, $P < 0.0001$ versus control; ‡, $P < 0.05$; †, $P < 0.0001$ versus same data without cilastatin.

HeLa cells were exposed to increasing concentrations of cisplatin for 24 and 48 h, a dose- and time-dependent cell death was observed. Cilastatin did not have any effect against the cisplatin-induced loss of cell viability (Fig. 7A). We measured DNA-bound Pt both in adherent and nonadherent HeLa cells

after 24-h exposure to 30 μM cisplatin. Pt concentration was double in nonadherent cells. As expected, cilastatin coinubation did not modify cisplatin binding to DNA (Fig. 7B). To confirm the absence of DHP-I in HeLa cells, we measured the specific DHP-I activity on Gly-Phe dipeptides and its sensitivity to cilastatin inhibition. Figure 7C shows the activity of cilastatin-sensitive DHP-I activity in HeLa cells compared with RPTECs.

Effects of Cisplatin and Cilastatin in Apoptotic Gene Expression in RPTECs. The reduction in DNA-bound Pt induced by cilastatin may play a role in the observed nephroprotection. However, it did not explain why only apoptotic-linked but not necrotic-linked processes were affected by cilastatin. In an attempt to establish whether cilastatin interference with cisplatin death induction could be exclusively explained in terms of reduction in cell cisplatin availability, we decided to explore the gene expression of $\text{TNF}\alpha$, Fas, and Fas-L as mediators of apoptosis. Cisplatin increased $\text{TNF}\alpha$ and Fas mRNA in RPTECs at 24 h, but in contrast it did not modify the level of Fas-L (real-time PCR; Fig. 8). Cilastatin had no effect on the expression of any of the studied genes (Fig. 8), suggesting that transcriptional changes were probably not relevant in cilastatin protection.

Effect of Cisplatin and Cilastatin in Fas-L Distribution. We finally explored the possibility that cilastatin-DHP-I interaction could be related to the post-transcriptional induction of apoptosis by cisplatin. Because caspase 3 and caspase 8 were actively induced by cisplatin, we decided to study whether cilastatin modified other steps upstream in the extrinsic pathway of apoptosis. The expression and cell membrane localization of Fas-L were followed by confocal microscopy in RPTECs treated with 30 μM cisplatin for very short periods. Fas-L was identified as specified under *Materials and Methods*. In Fig. 9A, top, Fas-L is identified on the cell surface after 30-min incubation, but it disappeared from the membrane after 2 h. In the presence of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin, a similar pattern was observed at 30 min. However, after 2 h of treatment, Fas-L was still attached to the membrane, suggesting an inter-

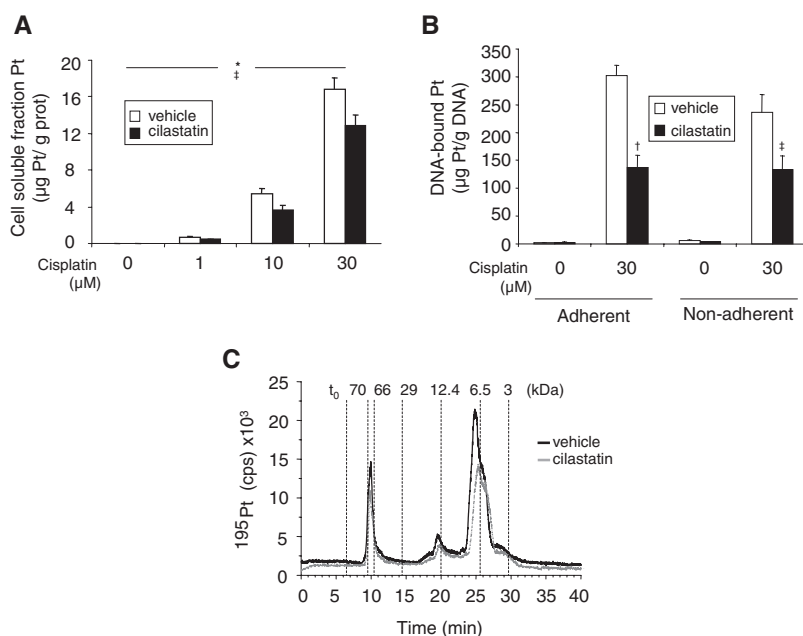


Fig. 6. Effects of cilastatin on cisplatin uptake and speciation analysis in RPTECs. **A**, platinum was measured in RPTEC-soluble fractions using quadrupole ICP/MS. RPTECs were treated with cisplatin in the presence or absence of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin for 24 h. Values were expressed as the mean \pm S.E.M. of platinum concentration expressed in micrograms of Pt per grams of protein ($n = 4$ different experiments). ANOVA model, $P < 0.0001$; *, cilastatin effect, $P < 0.05$; ‡, dose effect, $P < 0.05$. **B**, DNA-bound platinum was measured under the same conditions using the same methods after DNA extraction from treated RPTECs. Data are presented as the mean \pm S.E.M. of four experiments. ANOVA model, $P < 0.0001$. ‡, $P < 0.05$; †, $P < 0.0001$ versus same data without cilastatin. **C**, SEC/ICP/MS (^{195}Pt signal) chromatograms from cytosols of RPTECs treated with 10 μM cisplatin with or without 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin for 24 h. The main chromatographic peaks for the two samples present the same retention times and similar relative intensity. The graph represents three separate experiments.

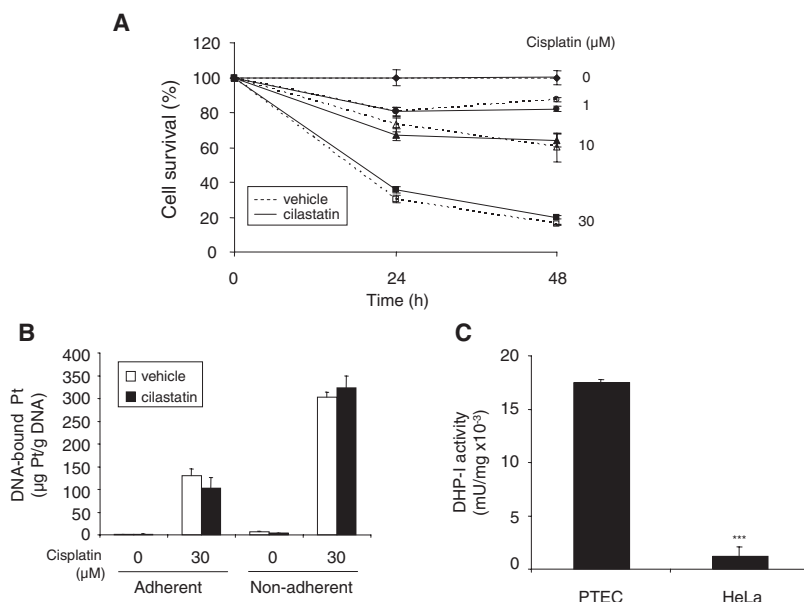


Fig. 7. Effect of cilastatin on the tumoricidal activity of cisplatin on HeLa cells. HeLa cells were treated with cisplatin alone (1, 10, and 30 μM) or in combination with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin. A, loss of cell viability was determined at 24 and 48 h by the ability to reduce MTT (see *Materials and Methods*). HeLa incubated in the absence of cisplatin and cilastatin was used as 100%. Values are expressed as the mean \pm S.E.M. of four different experiments. ANOVA model, $P < 0.0001$; effect of cisplatin, $P < 0.0001$; effect of cilastatin, N.S.; effect of time, $P < 0.0001$; cilastatin \times cisplatin, N.S.; cilastatin \times time, N.S. B, DNA-bound platinum was measured in HeLa cells isolated DNA using quadrupole ICP/MS. HeLa cells were treated with 30 μM cisplatin in the presence or absence of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin for 24 h. Values were expressed as the mean \pm S.E.M. of platinum concentration expressed in microgram of Pt per gram of DNA ($n = 4$ different experiments). C, DHP-I-specific activity ($\text{mU}/\text{mg} \times 10^{-3}$) in cultured RPTECs and HeLa. Activity was determined by the hydrolysis of 1 mM Gly-Phe-*p*-nitroanilide in the presence or absence of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cilastatin. *p*-Nitroanilide absorbance was followed at 410 nm. ***, $P < 0.0001$ versus RPTECs.

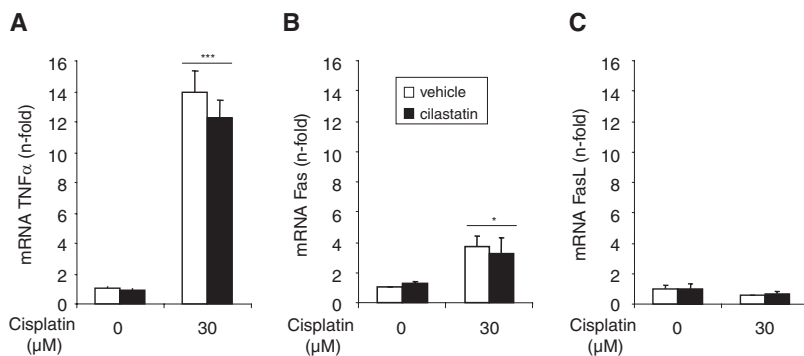


Fig. 8. Effects of cisplatin and cilastatin on mRNA expression of apoptotic genes in RPTECs. RPTECs were cultured in the presence of 30 μM cisplatin and cisplatin + cilastatin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. Expression of TNF α (A), Fas (B), and Fas-L (C) was analyzed by quantitative real-time PCR. Results are mean \pm S.E.M. of four separate experiments. ANOVA models, $P < 0.0001$. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0001$ versus control.

ference with ligand site internalization. Quantification of Fas-L staining was performed several times (0 and 30 min and 2 h) as shown in Fig. 9B.

Discussion

Cisplatin accumulation in renal cells causes nephrotoxicity, the main disadvantage of clinical use of cisplatin in oncology (Arany and Safirstein, 2003). The highest concentrations of cisplatin in the kidney are reached in the proximal tubule, where toxicity is both time- and dose-dependent (Ciarimboli et al., 2005; Yao et al., 2007). Proximal tubular cell death is considered the main pathophysiological mechanism underlying cisplatin nephrotoxicity and acute kidney injury and a limiting factor for its clinical use (Pabla and Dong, 2008).

Renal tubular cell death after *in vitro* exposure to cisplatin has been well documented (Lieberthal et al., 1996; Okuda et al., 2000; Cummings and Schnellmann, 2002; Park et al., 2002). Direct observation of our primary cell cultures under treatment with cisplatin characteristically displayed apoptotic morphological changes that were fully consistent with previous observations (Okuda et al., 2000; Park et al., 2002; Price et al., 2004; Nagothu et al., 2005; Jiang et al., 2007).

In our primary cell culture of RPTECs, cisplatin causes a dose- and time-dependent loss of cells. Although there is

some necrosis as confirmed by LDH release to the medium, most of the cell death seems to be mediated by apoptosis activation. In proximal cells, cisplatin-induced apoptosis may follow both intrinsic and extrinsic pathways. As expected, RPTECs incubated in the presence of cisplatin presented severe mitochondrial damage observed in different ways, including loss of $\Delta\Psi\text{m}$, release of cytochrome *c*, and a diminished capacity to reduce MTT to formazan (Park et al., 2002; Nagothu et al., 2005). In our experimental setup, TNF α and Fas induction and caspase 8 and 3 activation suggest a relevant involvement of the extrinsic pathway, with persistent caspase activation after 48 h of exposure. Damaged cells quickly lose the adherent properties.

In this study, we show that cilastatin, a specific inhibitor of tubular brush-border DHP-I, attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity *in vitro*, probably in more than one way. At a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, cilastatin reduced cisplatin-induced caspase activation, cytochrome *c* release, membrane depolarization, nuclear condensation, DNA fragmentation, and annexin V exposure and ameliorated viability of surviving cells. Harvesting and reseeding surviving cells allows quantifying the number of CFUs several days after the injury, and consequently the ability to restore a damaged tubule. Cilastatin not only reduced the initial damage to RPTECs but also enabled surviving cells to undergo a better recovery.

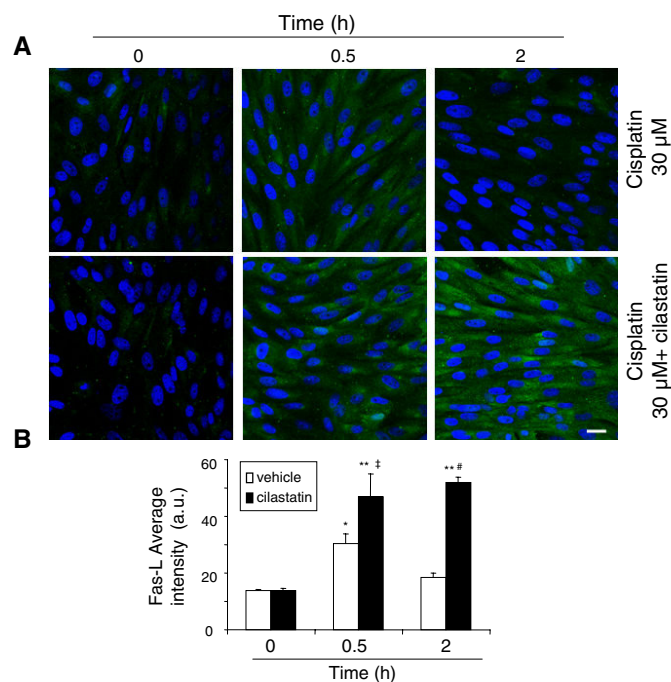


Fig. 9. Effects of cisplatin and cilastatin on immunofluorescence localization of Fas-L. RPTECs were cultured on sterile coverslips and treated for the indicated periods with 30 μ M cisplatin in the presence or absence of cilastatin (200 μ g/ml). A, confocal microscopy images are a representative experiment of three immunofluorescence stainings of Fas-L. B, summary of the quantification of Fas-L fluorescence intensity is presented as mean \pm S.E.M. ANOVA model, $P < 0.005$; cilastatin effect, $P < 0.001$; time effect, $P < 0.005$; cilastatin \times time, $P < 0.05$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ versus control; #, $P < 0.01$, †, $P < 0.05$ versus same data without cilastatin. Bar, 20 μ m.

We chose a concentration close to the expected plasma levels reached in humans treated with imipenem/cilastatin—200 μ g/ml—even if it was not the most protective concentration. Cilastatin by itself had no significant effects on growth dynamics, cell confluence, or monolayer morphology of RPTECs (Pérez et al., 2004).

Previous results from our group showed that cilastatin also reduced the toxicity of cyclosporine A and tacrolimus by inhibiting their transcellular transport and consequently their accumulation in the cell (Pérez et al., 2004; Tejedor et al., 2007). Accordingly, we first hypothesized that cilastatin could interfere with cisplatin intracellular accumulation.

Our results show that in the presence of cilastatin there was a modest dose-dependent reduction in cisplatin recovered from cell-soluble fractions. However, cilastatin reduced significantly the amount of DNA-bound cisplatin in monolayer populations and nonadherent cells. Cisplatin is known to permeate proximal tubular cells through apical and basolateral transporters (Miura et al., 1987; Endo et al., 2000), and there is recent evidence that both basolateral OCT1 and OCT2 and copper transporter Ctr1 are involved in cisplatin transport, accumulation, and toxicity (Ciarimboli et al., 2005; Yokoo et al., 2007; Pabla et al., 2009). In both cases, apoptosis and accumulation of cisplatin were decreased but not eliminated in the presence of competitive organic cations or transporter knockdown (Ciarimboli et al., 2005; Yokoo et al., 2007; Pabla et al., 2009). Once inside the cell, the relatively low intracellular chloride concentrations promote the dissociation of the chloride ions from the Pt molecule, thus increasing formation of the reactive, aquated species of cisplatin, which

readily interact with intracellular biomolecules (Daley-Yates and McBrien, 1985). Our analyses of intracellular Pt content and the Pt speciation studies on cisplatin-treated RPTECs in the presence or absence of cilastatin showed that cilastatin significantly reduced cisplatin accumulation and DNA binding but did not modify the chromatographic profile corresponding to Pt-containing biomolecules. This indicates that the identity of Pt-biomolecules in the cell is not altered. Therefore, it seems that entry of cisplatin in the cell is partially impaired after administration of cilastatin, with no changes in intracellular cisplatin metabolism.

On the other hand, cilastatin did not prevent cisplatin activation of genes of death, such as TNF α or Fas, and could not prevent or reduce necrotic cell death. Therefore, reduction in cisplatin intracellular accumulation or in binding DNA was possibly not the only mechanism behind nephroprotection because no pretranscriptional effects were evident.

Caspase 8 and caspase 3 activation suggested a positive role for extrinsic pathway in the observed toxicity of cisplatin on RPTECs (Tsuruya et al., 2003). Cilastatin's first effect should be located in a step between cisplatin-dependent gene induction (not modified by cilastatin) and caspase activation (reduced by cilastatin). Cilastatin affinity for membrane-bound DHP-I made us focus on a potential interaction at the level of cell death receptor signaling. Cisplatin may induce very rapid Fas clustering in the membrane lipid rafts of cancer cells and may trigger the apoptotic extrinsic cascade, even in the absence of Fas-L (Dimanche-Boitrel et al., 2005). Trimerization of Fas seems to be a rate-limiting step for the process. We have shown that Fas-L binding to the RPTEC membrane is clearly visible 30 min after cisplatin exposure, and 2 h later Fas-L binding is no longer visible. This scenario changes when cilastatin is present: Fas-L binds cell membrane after 30 min of cisplatin exposure, but 2 h later Fas-L is still binding the membrane surface, with no apparent processing. This interference could be causally related to reductions in caspase 8 and caspase 3 activations, annexin V exposure, mitochondrial damage, cell detachment, and nucleosome formation observed when cilastatin is coincubated with cisplatin.

Although the exact mechanism behind this interference is not yet clear, it was very relevant to know whether other cell models without cilastatin target on their membranes would be protected by cilastatin against cisplatin toxicity. HeLa cells were our choice because of their tumor origin, the absence of brush border, and the virtual absence of DHP-I activity, this point being directly assessed by us. As expected, cisplatin did cause a sustained and dose-dependent death on HeLa cells, as estimated by the progressive reduction in cell viability (MTT reduction capacity). However, cilastatin did not modify any of these parameters, being not at all protective. DNA-bound cisplatin was not modified by cilastatin in either monolayer or supernatants.

Cilastatin is a molecule specifically designed to inhibit brush border-sorted DHP-I (Parkin et al., 2001; Garner et al., 2007). It is even probable that DHP-I is primarily located in apical cholesterol rafts (Pang et al., 2004) near the Fas site (Dimanche-Boitrel et al., 2005). We do not know whether DHP-I activity is necessary in the mediation of the apoptosis extrinsic signalization or whether it is just an unwanted

neighbor whose binding to cilastatin may cause a steric interference with the process.

This work supports a new role for cilastatin in reducing cisplatin-induced nephrotoxicity. Identification of additional targets for cilastatin in this protective mechanism, together with currently available pharmacological data on cilastatin, could enable us to develop potent therapeutic strategies for renal function preservation in cancer patients.

Acknowledgments

We thank Dr. Rafael Samaniego for help with confocal microscopy, Dr. Paqui G. Traves for technical assistance with real-time PCR, and Merck Sharp and Dohme for providing the cilastatin used in the study.

This work is dedicated to the memory of Remedios Fernández (1945–2009).

References

- Arany I and Safirstein RL (2003) Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* **23**:460–464.
- Binks SP and Dobrota M (1989) Distribution of platinum amongst the subcellular organelles of the rat kidney after oral administration of cisplatin, in *Nephrotoxicity. In Vitro to In Vivo Animals to Man* (Bach PH and Lock EA eds) pp 331–347, Plenum Press, New York.
- Bouliskas T and Vougiouka M (2003) Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep* **10**:1663–1682.
- Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, and Schlatter E (2005) Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* **167**:1477–1484.
- Cummings BS and Schnellmann RG (2002) Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **302**:8–17.
- Daley-Yates PT and McBrien DC (1985) A study of the protective effect of chloride salts on cisplatin nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* **34**:2363–2369.
- Dimanche-Boitrel MT, Meurette O, Rebillard A, and Lacour S (2005) Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death. *Drug Resist Updat* **8**:5–14.
- Endo T, Kimura O, and Sakata M (2000) Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line. *Toxicology* **146**:187–195.
- Gallego-Delgado J, Lazaro A, Gomez-Garre D, Osende JI, Gonzalez-Rubio ML, Herraiz M, Manzarbeitia F, Fortes J, Fernandez-Cruz A, and Egidio J (2006) Long-term organ protection by doxazosin and/or quinapril as antihypertensive therapy. *J Nephrol* **19**:588–598.
- Garner AE, Smith DA, and Hooper NM (2007) Sphingomyelin chain length influences the distribution of GPI-anchored proteins in rafts in supported lipid bilayers. *Mol Membr Biol* **24**:233–242.
- Go RS and Adjei AA (1999) Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* **17**:409–422.
- Havlin KA, Kuhn JG, Myers JW, Ozols RF, Mattox DE, Clark GM, and von Hoff DD (1989) High-dose cisplatin for locally advanced or metastatic head and neck cancer. A phase II pilot study. *Cancer* **63**:423–427.
- Jiang M, Pabla N, Murphy RF, Yang T, Yin XM, Degenhardt K, White E, and Dong Z (2007) Nutlin-3 protects kidney cells during cisplatin therapy by suppressing Bax/Bak activation. *J Biol Chem* **282**:2636–2645.
- Lazaro A, Gallego-Delgado J, Justo P, Esteban V, Osende J, Mezzano S, Ortiz A, and Egidio J (2005) Long-term blood pressure control prevents oxidative renal injury. *Antioxid Redox Signal* **7**:1285–1293.
- Lee KW, Jeong JY, Lim BJ, Chang YK, Lee SJ, Na KR, Shin YT, and Choi DE (2009) Sildenafil attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* **257**:137–143.
- Lieberthal W, Triaca V, and Levine J (1996) Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* **270**:F700–F708.
- Liverpool Head and Neck Oncology Group (1990) A phase III randomised trial of cisplatin, methotrexate, cisplatin + methotrexate and cisplatin + 5-FU in end stage squamous carcinoma of the head and neck. Liverpool Head and Neck Oncology Group. *Br J Cancer* **61**:311–315.
- Miura K, Goldstein RS, Pasino DA, and Hook JB (1987) Cisplatin nephrotoxicity: role of filtration and tubular transport of cisplatin in isolated perfused kidneys. *Toxicology* **44**:147–158.
- Nagathu KK, Bhatt R, Kaushal GP, and Portilla D (2005) Fibrate prevents cisplatin-induced proximal tubule cell death. *Kidney Int* **68**:2680–2693.
- Norby SR, Alestig K, Björnegård B, Burman LA, Ferber F, Huber JL, Jones KH, Kahan FM, Kahan JS, Kropp H, et al. (1983) Urinary recovery of *N*-formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of *N*-formimidoyl thienamycin dehydropeptidase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **23**:300–307.
- Okuda M, Masaki K, Fukatsu S, Hashimoto Y, and Inui K (2000) Role of apoptosis in cisplatin-induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol* **59**:195–201.
- Pabla N and Dong Z (2008) Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* **73**:994–1007.
- Pabla N, Murphy RF, Liu K, and Dong Z (2009) The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**:F505–F511.
- Pang S, Urquhart P, and Hooper NM (2004) N-glycans, not the GPI anchor, mediate the apical targeting of a naturally glycosylated, GPI-anchored protein in polarised epithelial cells. *J Cell Sci* **117**:5079–5086.
- Park MS, De Leon M, and Devarajan P (2002) Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol* **13**:858–865.
- Parkin ET, Turner AJ, and Hooper NM (2001) Differential effects of glycosphingolipids on the detergent-insolubility of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase. *Biochem J* **358**:209–216.
- Pérez M, Castilla M, Torres AM, Lázaro JA, Sarmiento E, and Tejedor A (2004) Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* **19**:2445–2455.
- Price PM, Safirstein RL, and Megyesi J (2004) Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**:F378–F384.
- Servais H, Ortiz A, Devuyt O, Denamur S, Tulkens PM, and Mingeot-Leclercq MP (2008) Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis* **13**:11–32.
- Tejedor A, Torres AM, Castilla M, Lázaro JA, de Lucas C, and Caramelo C (2007) Cilastatin protection against cyclosporin A-induced nephrotoxicity: clinical evidence. *Curr Med Res Opin* **23**:505–513.
- Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Hirakata H, and Iida M (2003) Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**:F208–F218.
- Wei Q, Dong G, Franklin J, and Dong Z (2007) The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* **72**:53–62.
- Wu YJ, Muldoon LL, and Neuwelt EA (2005) The chemoprotective agent *N*-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **312**:424–431.
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, and Nugent K (2007) Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* **334**:115–124.
- Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, and Inui K (2007) Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* **74**:477–487.

Address correspondence to: Alberto Tejedor, Renal Physiopathology Laboratory, Department of Nephrology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo 46, 28007, Madrid, Spain. E-mail: atejedor@senefro.org

Trabajo 8

“Protective effect of cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats”

Kidney International, 2012 (Aceptado)

Kidney International



Protective effect of cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats

Journal:	<i>Kidney International</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article-Basic Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Humanes, Blanca; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Nephrology Lazaro, Alberto; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Nephrology Camano, Sonia; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Nephrology Moreno-Gordaliza, Estefania; Universidad Complutense de Madrid, Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry Lazaro, Jose; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Nephrology Lara, Jose; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Pathology Ortiz Arduan, Alberto; Fundacion Jimenez Diaz, Dialysis Gomez-Gomez, Maria; Universidad Complutense de Madrid, Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry Martin-Vasallo, Pablo; Universidad de La Laguna, Biochemistry and Molecular Biology Tejedor, Alberto; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Nephrology
Subject Area:	Renal Pathology
Keywords:	acute kidney injury, cisplatin nephrotoxicity, renal protection, apoptosis, oxidative stress

SCHOLARONE™
Manuscripts

Protective effect of cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats

Blanca Humanes^{1*}, BSc; Alberto Lazaro^{1*}, PhD; Sonia Camano¹, PhD; Estefanía Moreno-Gordaliza², BSc; Jose A. Lazaro¹, PhD; Montserrat Blanco-Codesido³, PhD MD; Jose M. Lara, Tech⁴; Alberto Ortiz⁵, PhD MD; M. Milagros Gómez-Gómez², PhD; Pablo Martín-Vasallo⁶, PhD MD; Alberto Tejedor¹, PhD MD

¹Renal Physiopathology Laboratory, Department of Nephrology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense of Madrid, Madrid, Spain.

³Department of Medical Oncology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

⁴Department of Pathology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

⁵IISFundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

⁶Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain

*Both authors contributed equally to this work. The order of authors is arbitrary.

Address for correspondence: Alberto Tejedor, Renal Physiopathology Laboratory, Department of Nephrology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón. C/ Dr. Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain Tel: 34914265145. Fax: 3491-5868214. Email: atejedor@senefro.org

ABSTRACT

Cisplatin is an anticancer agent whose efficacy is marred by nephrotoxicity. Limiting this effect may enable higher doses to be administered and improve efficacy. Cilastatin binds renal dipeptidase I and prevents proximal tubular cells from cisplatin-induced apoptosis. We explored the *in vivo* relevance of these findings and the specificity of protection for tubular cells. Nephrotoxicity was induced in rats, and modulation of kidney injury and cisplatin pharmacokinetics after therapy with cilastatin were explored. The effect of cilastatin on apoptosis induced by cisplatin on several tumor cell lines was studied. Cisplatin increased serum blood urea nitrogen and creatinine levels and fractional excretion of sodium. Cisplatin decreased the glomerular filtration rate and promoted histological renal injury and expression in the renal cortex of caspases -3, -8 and -9, as well as Bax, Fas-L, Fas and HSP 27. It increased the Bax/Bcl-2 ratio and oxidative stress in kidney tissue and urine. All these features were decreased by cilastatin, which preserved renal function. Cilastatin reduced renal platinum content but did not modify the cisplatin area under the curve (AUC). Cisplatin promoted death in tumor cells that was not prevented by cilastatin. Cilastatin reduced *in vivo* cisplatin-induced nephrotoxicity without modifying the cytotoxic effects on tumor cells and the AUC of cisplatin, suggesting that cilastatin has the potential to prevent nephrotoxicity without compromising anticancer efficacy.

Keywords: apoptosis, cilastatin, cisplatin, nephrotoxicity, nephroprotection.

INTRODUCTION

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II) is a potent and reliable chemotherapeutic agent that is commonly used against solid tumors (1, 2). But cisplatin time and dose-dependent nephrotoxicity, restricts the use of high doses to maximize the therapeutic efficacy. In fact, 25-35% of patients develop evidence of nephrotoxicity following a single dose of cisplatin (3). Once cisplatin enters the cell, it is bioactivated by hydrolytic reactions. The chloride ligands are replaced by water molecules, transforming platinum (Pt) into mono-

and diaquadiammineplatinum (II) species. Aqua species are more reactive than the neutral molecule and react with DNA, creating intrastrand DNA-cisplatin cross-linking that causes cytotoxic lesions in tumors and other dividing cells (4). Therefore, although non-proliferating cells are relatively well protected, proximal tubule cells are an exception, as they are damaged by cisplatin. Finding an effective way to prevent cisplatin-induced nephrotoxicity has become a priority.

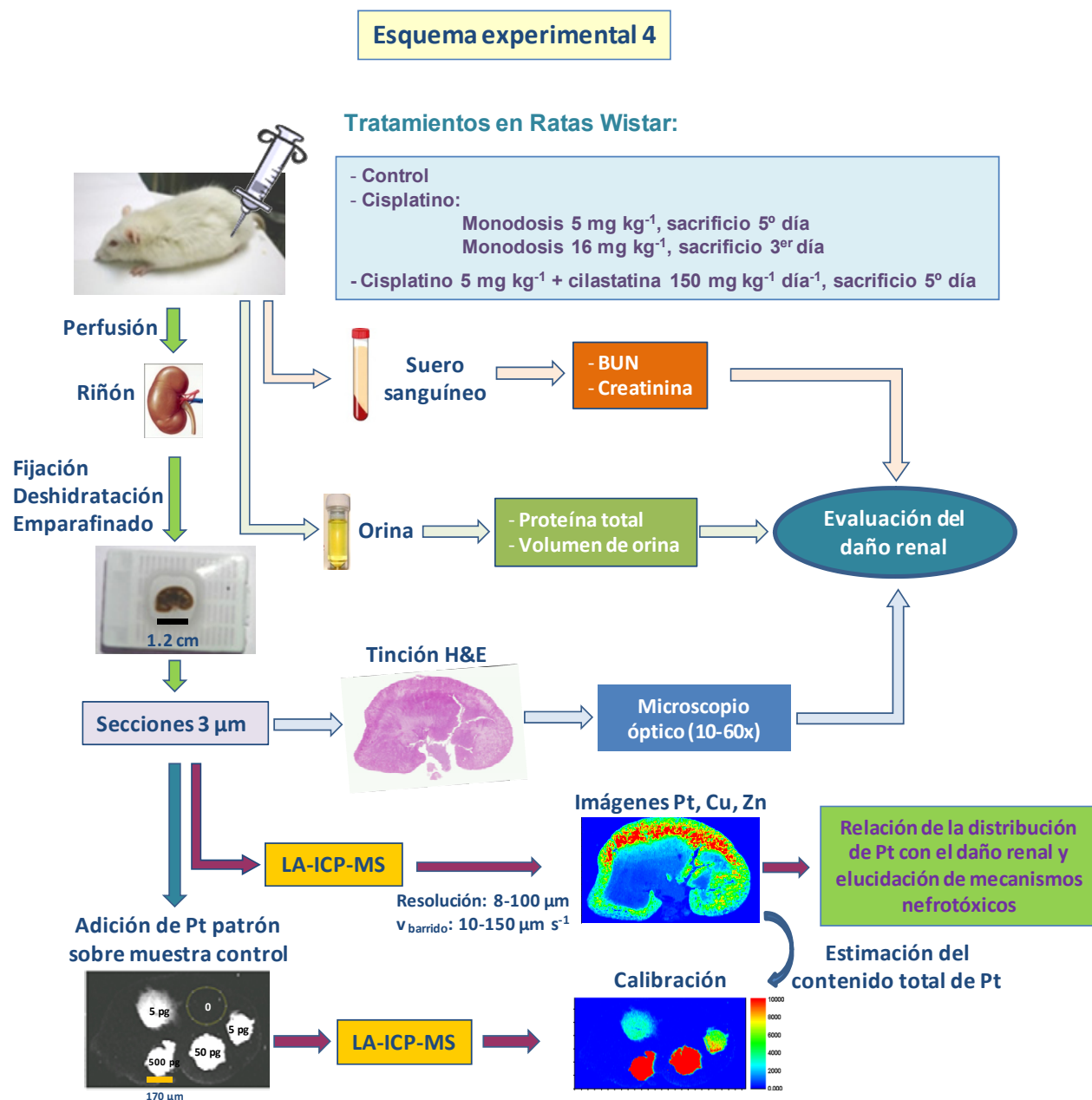
The mechanisms of tubular cell injury have been studied to develop nephroprotective approaches (5, 6). Several pathways of apoptosis —extrinsic, mediated by

III. 4. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE BIOIMAGEN ELEMENTAL EN RIÑÓN TRAS TRATAMIENTOS CON CISPLATINO

Las técnicas de bioimagen elemental permiten el análisis directo sobre secciones de tejido, ofreciendo información cuantitativa acerca de la distribución de los elementos en estudio. El empleo de estas técnicas sobre órganos afectados durante terapias con cisplatino es de gran interés para establecer una relación entre la acumulación del fármaco en las diferentes estructuras tisulares y los daños causados en éstas. Además, esta información permitiría seleccionar zonas de tejido de interés para efectuar estudios de relevancia desde el punto de vista metalómico. En particular, dado el problema que supone la nefrotoxicidad asociada a los tratamientos con cisplatino, es de interés abordar este tipo de estudios en riñones de organismos impactados con el fármaco y parece evidente que esto permitiría arrojar luz sobre las causas subyacentes a dichos efectos tóxicos.

El trabajo 9 (**“Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies”** *Analytical Chemistry*, 2011, 83(20), 7933-7940) se centra en el desarrollo de una metodología basada en LA-ICP-MS para la obtención de bioimágenes elementales en riñón tras el tratamiento con cisplatino. Para ello se trataron diversas ratas Wistar con distintas dosis de cisplatino, produciendo cierto grado de daño renal en las mismas. Tras la perfusión, extracción y emparafinado de sus riñones, se procedió al análisis mediante LA-ICP-MS de secciones sagitales de tejido de 3 μm de espesor. Además de estudiar la distribución de Pt, se monitorizaron elementos esenciales como Cu y Zn con objeto de evaluar la influencia del tratamiento con cisplatino en su acumulación renal, por comparación con tejidos de ratas control. Se estudió la influencia de los parámetros de análisis y la presencia de parafina en las muestras sobre la calidad de las imágenes resultantes y su resolución; se evaluó la reproducibilidad del método y se calcularon los límites de detección obtenidos. Asimismo, mediante un sencillo método basado en la adición de disoluciones patrón de platino sobre láminas de un tejido control y la ablación de éste, se obtuvo un calibrado que permitió estimar los niveles de Pt en las diferentes secciones de riñón analizadas. Los resultados obtenidos se pusieron en relación con el daño renal producido, que fue evaluado mediante determinación de parámetros bioquímicos en orina y suero, y mediante estudio histológico en secciones de tejido. Finalmente, se empleó la metodología desarrollada para evaluar el efecto de la co-administración de cisplatino y cilastatina, particularmente en la acumulación renal de platino. Para afrontar todos estos estudios, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Jakubowski en el Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) de Berlín, donde se

realizaron los análisis mediante LA-ICP-MS, y con el grupo del Dr. Tejedor del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, donde se efectuaron los tratamientos de las ratas y se determinaron los diferentes parámetros bioquímicos mencionados. En el esquema experimental 4 se resumen los ensayos realizados.



Trabajo 9

“Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies”

Analytical Chemistry, (2011), 83(20), 7933-7940

Este trabajo fue presentado como Comunicación Oral en el “3rd International Symposium on Metallomics” celebrado en Münster, Alemania, en Junio de 2011

Elemental Bioimaging in Kidney by LA–ICP–MS As a Tool to Study Nephrotoxicity and Renal Protective Strategies in Cisplatin Therapies

Estefanía Moreno-Gordaliza,[†] Charlotte Giesen,^{‡,§} Alberto Lázaro,^{||} Diego Esteban-Fernández,[§] Blanca Humanes,^{||} Benito Cañas,[†] Ulrich Panne,^{‡,§} Alberto Tejedor,^{||} Norbert Jakubowski,[‡] and M. Milagros Gómez-Gómez^{*,†}

[†]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

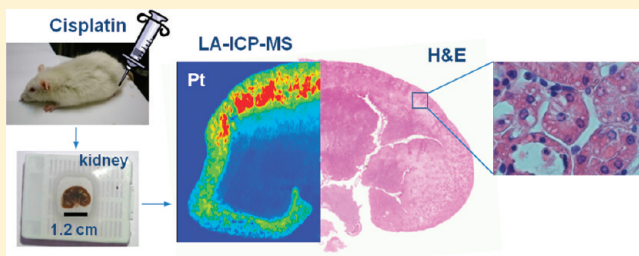
[‡]BAM Federal Institute for Materials Research & Testing, Richard-Willstätter Str. 11, 12489, Berlin, Germany

[§]Department of Chemistry, Humboldt-Universität zu Berlin, Brook-Taylor Str. 2, 12489 Berlin, Germany

^{||}Renal Pathophysiology Laboratory, Department of Nephrology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/Dr. Esquerdo 46, 28007, Madrid, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: A laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA–ICP–MS)-based methodology is presented for Pt, Cu, and Zn bioimaging on whole kidney 3 μm sagittal sections from rats treated with pharmacological doses of cisplatin, which were sacrificed once renal damage had taken place. Pt turned out to accumulate in the kidney cortex and corticomedullary junction, corresponding to areas where the proximal tubule S3 segments (the most sensitive cells to cisplatin nephrotoxicity) are located. This demonstrates the connection between platinum accumulation and renal damage proved by histological examination of HE-stained sections and evaluation of serum and urine biochemical parameters. Cu and Zn distribution maps revealed a significant displacement in cells by Pt, as compared to control tissues. A dramatic decrease in the Pt accumulation in the cortex was observed when cilastatin was coadministered with cisplatin, which can be related to its nephroprotective effect. Excellent imaging reproducibility, sensitivity (LOD 50 fg), and resolution (down to 8 μm) were achieved, demonstrating that LA–ICP–MS can be applied as a microscopic metal detector at cellular level in certain tissues. A simple and quick approach for the estimation of Pt tissue levels was proposed, based on tissue spiking.



Since the discovery of its antitumor properties,¹ cisplatin ($\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) has been successfully used for the treatment of solid tumors.² Nowadays, it is employed in more than half of the oncologic treatments, usually in combination with other drugs.³ Its antitumor activity is mainly due to its ability to bind and distort the DNA in the nucleus, resulting in the induction of either apoptosis or necrosis of tumor cells.⁴ Other biomolecules containing nucleophilic groups, such as proteins, are likely to interact with cisplatin, as well, due to the high reactivity presented by platinum, playing a role in the transport, cell uptake, and excretion of the drug.⁵ Concerning side-effects, which are dose-limiting for these treatments,⁶ Pt-protein interactions and Pt accumulation in tissues may also be involved. Of particular relevance during cisplatin-based therapies is nephrotoxicity, occurring in one-third of the patients.⁷ Kidney is the main route for cisplatin excretion, where it accumulates to a greater extent than in other organs.⁸ Studies in cell models indicate that this accumulation affects mainly the renal tubules, which undergo cell death, both in the form of apoptosis and necrosis.⁷ The main renal damage takes place in the epithelial

cells from proximal tubules, but distal tubules can also be affected.⁷ It is clear that understanding the mechanisms involved in cisplatin-induced nephrotoxicity is of utmost importance for designing improved treatments with reduced side-effects.⁷ Many diverse nephroprotective approaches basing on different targets have been tested both in vivo and in vitro.^{7,9} However, protective effects are usually incomplete and the effect on the cytotoxicity on tumor cells is not fully understood. Since toxicity is related to Pt accumulation, information on metal distributions in an organ such as kidney after in vivo treatments would be helpful to find a correlation with the renal morphology/physiology/histology and may shed some light on the cisplatin nephrotoxicity mechanisms. Thus, bioimaging of metal distributions, in particular Pt, may be useful for this purpose.

Metals are usually heterogeneously distributed in tissues or cells and can be present either free or generally bound to proteins,

Received: July 27, 2011

Accepted: September 14, 2011

Published: September 14, 2011

depending on their affinity and stability. Metalloproteins account for one-third of the whole proteome and play a key role in many biological processes.¹⁰ Bioimaging of tissue sections is increasingly applied in modern medicine as it can be an important tool for the understanding and interpretation of diseases, especially in cancer diagnostics.¹¹ For this reason, bioimaging analytical techniques have been developed in the last years to monitor elemental and molecular distributions in tissues, as has been recently reviewed.¹² These include scanning electron microscopy with energy-dispersive X-ray analysis (SEM-EDX),¹³ synchrotron X-ray fluorescence (SXRF),¹² proton-induced X-ray emission (PIXE),¹⁴ secondary ion mass spectrometry (SIMS), matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)¹⁵ and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS).¹⁶ The latter seems to be the most convenient alternative for elemental (metals and heteroatoms such as sulfur and phosphorus) bioimaging in tissue sections, since it provides multielemental detection with high sensitivity and high spatial resolution.¹⁶ Indeed, LA-ICP-MS has been widely used over the last years for the analysis of biological samples. By this means, selenoproteins could be detected after gel electrophoresis¹⁷ and heavy metals map distributions were obtained in plants.¹⁶ Using LA-ICP-MS, tumor boundaries were identified in lymph node biopsies by monitoring ³¹P.¹⁸ On the other hand, the quantitative distribution of Cu, Zn, U, and Th was investigated in thin sections of human brain.¹⁹ More recently, images of element distribution of metals in mouse heart tissue were compared to SIMS images of alkali metals and biomolecules.²⁰ Furthermore, an attempt at the detection of metals by LA-ICP-MS in mouse kidney after cisplatin treatment has been reported.²¹ Moreover, another LA-ICP-MS methodology was applied for the quantification of Pt in rat brain tissue after carboplatin administration.²² However, in both cases, the treated animals were killed only a few hours after the administration of cisplatin, which is not enough time for significant Pt accumulation in tissues and renal damage.⁹

Herein, a methodology for LA-ICP-MS-based bioimaging of kidney tissues from rats treated with pharmacologic doses of cisplatin has been investigated, providing a spatial resolution sufficient to study metal accumulation within the renal substructures and its connection with renal damage. The accumulation of Pt and the distribution of Cu and Zn were monitored after renal damage had taken place. Furthermore, the application of the bioimaging methodology for the study of the protective effect of cilastatin on cisplatin nephrotoxicity has also been tackled. Recently, cilastatin has been demonstrated to reduce cisplatin nephrotoxicity both in a renal proximal tubule epithelial cells (RPTECs) model²³ and in an in vivo rat kidney model.²⁴

EXPERIMENTAL SECTION

Drugs. Cisplatin was obtained from Pharmacia (Barcelona, Spain). Cilastatin was kindly provided by Merck Sharp and Dohme S.A., (Madrid, Spain). Both drugs were administered dissolved in saline solution (0.9% NaCl, Braun Medical S.A., Barcelona, Spain).

Animal Model and Sample Preparation. Treatments were applied on 7-week-old, female Wistar rats (WKY) (Criffa, Barcelona, Spain). The animals were treated at the facilities of Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain). Rats were housed in controlled light (12 h light/dark cycle), temperature and humidity conditions with free access to food and water. Animals

were handled following the guidelines of the National Council for Care of Laboratory Animals, Spain.

Animals were divided into four groups: A1: untreated control rats; A2: cilastatin-treated rats (75 mg kg⁻¹ of body weight (bw) every 12 h intraperitoneally (i.p.)); A3: cisplatin-injected rats (5 mg kg⁻¹ bw in a single dose at day 0, i.p.); and A4: cisplatin (as in group A3) plus cilastatin (as in group A2) treated rats. The medium used for cisplatin (10 mL kg⁻¹ bw) and cilastatin (2.5 mL kg⁻¹ bw) was 0.9% saline solution. Group A1 received the same saline solution dose without any active treatment. For comparison and method development, a fifth group of animals (B1) was injected with cisplatin 16 mg kg⁻¹ bw in a single dose. Prior to the sacrifice, urine of each animal was collected in metabolic cages over a 24 h period and the volume was measured. After five (A1, A2, A3, A4) or three days (B1) of treatment, animals were anesthetized and killed. Blood samples were obtained and serum was isolated by centrifugation. Kidneys were perfused with ice-cold saline and quickly removed. For elemental imaging, complete perfusion of the kidneys is required in order to remove blood, which if present, can produce misleading results on elemental distributions in the organ. Kidneys were decapsulated and immediately placed in 5% formaldehyde, where they were kept at room temperature (RT) for 48 h. After formalin fixation, tissues were dehydrated by a series of ethanol (EtOH, Merck, Darmstadt, Germany) solutions at RT: (70% EtOH, 30 min; 90% EtOH, 30 min (twice); 100% EtOH, 30 min (twice)). Further treatment in xylene for 1 h was repeated twice, followed by paraffin-embedding. 3 μ m sagittal sections were obtained with a commercial SM 2010R microtome (Leica microsystems, Wetzlar, Germany) and mounted onto Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Germany). For tissue dewaxing, the sections were treated with xylene and dehydrated by a series of graded alcohols prior to laser ablation, following standard protocols.¹⁸

Histological Studies. Parallel 3- μ m sagittal sections of rat kidneys were stained with hematoxylin (hematoxylin solution Gil III modified, Merck, Darmstadt, Germany) and eosin (Shandon Y eosin alcoholic, Thermo Scientific, Germany) (HE). Microphotographs were taken from the sections for histological examination using an inverted IX70 microscope (Olympus).

Renal Failure-Indicating Biochemical Parameters. Creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were analyzed in serum using a Dimension Rxl autoanalyzer (Dade-Behring, Siemens, Eschborn, Germany). Total protein content in urine was analyzed by using the sulfosalicylic acid method.²⁵

LA-ICP-MS Analysis. Experiments were conducted with a commercial laser ablation system (New Wave 213, Nd:YAG 213 nm) coupled to an ICP sector field MS (Element XR, Thermo Fisher Scientific, Germany). The ICP-MS was synchronized with the LA unit in external triggering mode. Kidney sections were inserted into the two-volume cell (New Wave) and ablated line by line. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 L min⁻¹ and argon was added at a typical flow rate of 0.8 L min⁻¹ before reaching the ICP torch. The ICP was tuned daily for maximum ion intensity, keeping the oxide ratio (ThO/Th) below 1% during ablation of a microscope glass slide. An average day-to-day coefficient of variation of 12% for ¹³⁷Ba signal was observed along the analyses. The laser was tuned for optimal sample ablation and operated with 33% laser energy and 20 Hz repetition rate. Laser spot size and scan speed were typically set at 8–100 μ m, 10–150 μ m s⁻¹, respectively. ICP-MS operating conditions are the following: RF plasma source: 1350 W; Ar plasma

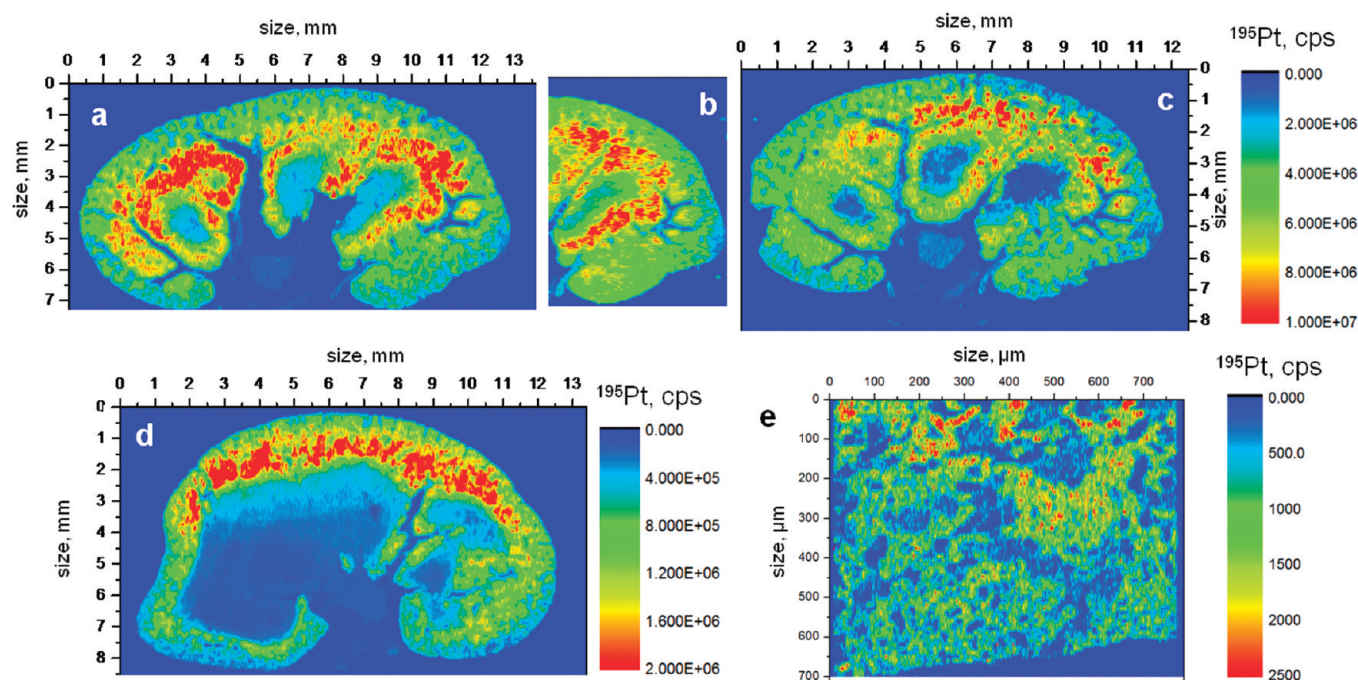


Figure 1. Evaluation of the LA-ICP-MS tissue imaging methodology. ^{195}Pt kidney images obtained from a rat treated with 16 mg kg^{-1} cisplatin at $100 \mu\text{m}$ laser spot size, $150 \mu\text{m s}^{-1}$ scan speed for (a) a dewaxed sagittal section, (b) a paraffin embedded section, and (c) a parallel dewaxed section; ^{195}Pt kidney images obtained from a rat treated with 5 mg kg^{-1} cisplatin at (d) $100 \mu\text{m}$ laser spot size, $150 \mu\text{m s}^{-1}$ scan speed for a dewaxed sagittal section; (e) at $8 \mu\text{m}$ laser spot size, $10 \mu\text{m s}^{-1}$ scan speed for a cortical area of a kidney slice.

gas: 15 L min^{-1} ; Ar carrier gas: 0.8 L min^{-1} ; Mass resolution ($m/\Delta m$): 300; Dwell time: 2 ms; scan type: EScan, Isotopes monitored: ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{194}Pt , ^{195}Pt , ^{196}Pt . Analysis times for whole tissue sections with $12 \times 8 \text{ mm}$ average dimensions were 3 h. LA-ICP-MS data were exported to Origin 8.5 (Originlab Corporations, Northampton, MA), where either intensity vs time profiles or color coded images were produced.

Quantification Methods. A control rat kidney was used for Pt calibration on tissue. The $12 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$ dewaxed section was spiked with $0.5 \mu\text{L}$ of 1000, 100, and 10 ng L^{-1} Pt standard solutions in 1% HNO_3 and air-dried. Tissue was ablated by adjacent single line scans with $100 \mu\text{m}$ laser spot size, $150 \mu\text{m s}^{-1}$ scan speed, 20 Hz repetition rate, and 33% laser energy. Integration of ^{195}Pt signal for the droplets on blank tissue, and whole rat kidney thin sections were carried out by the software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

RESULTS AND DISCUSSION

LA-ICP-MS as a Tool for Elemental Bioimaging: Analytical Features. Optimization of the methodology for the preparation of thin tissue slices and the instrumental parameters for the LA-ICP-MS analyses is crucial for obtaining high quality bioimages. A starting point for setting the instrumental parameters is the optimization described for LA-ICP-MS bioimaging analysis during immunohistochemistry assays in tissues,²⁶ which was adapted for the present work. First of all, it is vital that laser energy, frequency, spot diameter and scan speed are set to achieve complete ablation of the material during every line scan (without causing the cracking of neighboring tissue) to avoid fractionation effects during LA-ICP-MS analysis and to produce comparable elemental images. Spot size and scan speed are dependent on the image resolution required, which is limited by

the sensitivity of the element to be analyzed. Helium is preferred as a carrier gas, and its flow was set in a way that transport efficiency of the material ablated to the ICP-MS is optimal.²⁶ In order to maximize the attainable resolution and sensitivity for the analysis of metals in kidney tissue, very thin, $3 \mu\text{m}$, slices were employed. Typically, works on tissue bioimaging make use of thicker ($10\text{--}20 \mu\text{m}$) tissue slices, where resolution may be more limited as compared to the analysis of thinner slices. Very thin slices allow a clean ablation without tissue cracking and more tissue aerosol may be efficiently transported to the ICP, resulting in a higher sensitivity too. These facts are illustrated in Figure 1a, where platinum distribution is shown corresponding to a dewaxed kidney slice from a rat treated with cisplatin 16 mg kg^{-1} , in which line scans monitoring ^{195}Pt were performed with $100 \mu\text{m}$ laser spot size, $150 \mu\text{m s}^{-1}$ scan speed, 20 Hz repetition rate and 33% laser energy. The image was validated by ^{194}Pt monitoring, displaying the same elemental distribution (not shown). As expected, no significant interferences were observed for ^{195}Pt . As can be seen, the resolution attained allows a very clear distinction of the heterogeneous distribution of platinum in the whole tissue slice with high intensity signals. The Pt distribution reflects mainly DNA- and protein-coordinated Pt in the tissues. The analysis of a whole slice is achieved in a short time (3 h), preventing an instrumental drift, and thus, increasing the reliability of the elemental images obtained. The slight reduction of spot size to 80 and $100 \mu\text{m s}^{-1}$ scan speed resulted in longer analysis times (5 h 30 min) with no significant improvement in the excellent resolution afforded by the former analysis conditions. Therefore, $100 \mu\text{m}$ laser spot size, $150 \mu\text{m s}^{-1}$ scan speed were selected as the optimum for the metal distribution analysis in whole kidney slices.

On the other hand, the effect of paraffin in the tissue slices on the LA-ICP-MS analysis was also evaluated by analyzing a

Table 1. Renal-Failure Indicating Biochemical Parameters Measured in Rats^a

groups	S_{Creat} (mg dL ⁻¹)	BUN(mg dL ⁻¹)	U_{Vol} (mL/24 h)	U_{Prot} (mg/24 h)
A1: control	0.40 ± 0.02	37 ± 3	11 ± 2	22 ± 6
A2: control + Cil	0.39 ± 0.06	34 ± 2	11 ± 2	23 ± 3
A3: cisplatin 5 mg kg bw ⁻¹	1.4 ± 0.2 ^b	77 ± 5 ^b	21 ± 5 ^c	42 ± 1 ^c
A4: cisplatin 5 mg kg bw ⁻¹ + Cil	0.6 ± 0.1	36 ± 6	11 ± 2	28 ± 4

^a Cil: cilastatin, S_{Creat} : serum creatinine, BUN: blood urea nitrogen, U_{Vol} : urinary volume, U_{Prot} : urinary protein. Data are expressed as mean ± SEM (standard error of the mean), $n = 4$ animals per group. ^b $P < 0.001$. ^c $P \leq 0.05$ vs all other groups.

parallel kidney slice for the 16 mg kg⁻¹ cisplatin-treated rat, which had not been dewaxed. The corresponding image for ¹⁹⁵Pt monitoring (Figure 1b) shows a very similar distribution and signal intensity as compared to the right side of Figure 1a. As the resolution seems to be slightly lower in the Pt image for the paraffin-slice sample, probably due to paraffin melting during the ablation process, tissue dewaxing is preferred for LA-ICP-MS imaging of metals in tissues and was applied for further analyses. Moreover, in light of the results, the dewaxing process allowed the preservation of the Pt–biomolecule complexes present in the tissue. Analytical reproducibility was also studied by analyzing another parallel slice for the same kidney from a rat treated with 16 mg kg⁻¹ cisplatin. In this case, as can be seen in Figure 1c, similar distribution pattern and intensities were observed for platinum, as compared to the first replicate (Figure 1a) only with slight expected differences due to the heterogeneity in the distribution in the organ.

Another kidney slice from a rat treated with a pharmacologically relevant dose of 5 mg kg⁻¹ cisplatin was analyzed by LA-ICP-MS using the conditions selected above (100 μm laser spot size, 150 μm s⁻¹ scan speed). Figure 1d shows the image for the Pt distribution in the kidney section. Again, the resolution achieved allows the elucidation of the distribution of the element in the main renal structures. Due to the high intensities for the signals observed (10⁶ cps for ¹⁹⁵Pt), resolution of the images can be increased by significantly reducing spot size and scan speed. As an ultimate example, Figure 1e shows the Pt image of a cortical small area selected on a tissue section from a rat treated with 5 mg kg⁻¹ cisplatin, analyzed at 8 μm spot size, 10 μm s⁻¹ scan speed. As can be seen, a very high resolution was attained in the ¹⁹⁵Pt contour map with a signal quite above the low background. All this allows discerning the distribution of Pt within renal substructures, accumulating in the tubule cells, whereas in the glomerulus and tubule lumen Pt is clearly absent, as compared to a microphotograph (Supporting Information (SI) Figure S-1). In the previous example, the outstanding imaging capabilities of this methodology are demonstrated, and from this it can be concluded that LA-ICP-MS can be applied as a microscopic metal detector at cellular level in certain tissues.

ICP-MS excels by its exceptional accuracy and ease of calibration. However, elemental quantification of LA-ICP-MS is a very complex task regarding bioimaging on tissues. Some authors have developed quantification methods based on the production of matrix-matched laboratory standards¹⁹ or solution-based calibration,¹⁹ sometimes having proposed ¹³C as an internal standard.²⁷ In our case, mass differences to the isotopes of interest are rather large compared to ¹³C, impairing its use. Furthermore, this methodology was optimized on Superfrost Plus slides, which have an organic coating necessary for a clean ablation and a reduced background during glass ablation. Due to this organic coating, ¹³C is not applicable as an internal standard.

Concerning calibration, a quick and simple approach for estimating Pt levels in the tissue slices was performed by ablating a control kidney slice which had been spiked with different amounts of a Pt solution. As illustrated in SI Figure S-2, the 2D map shows four discrete locations of Pt where 500, 50, and 5 ($n = 2$) pg of Pt were spiked on the control tissue slice. A calibration curve was established based on the whole integrated areas of the dot spot for ¹⁹⁵Pt signal, after the subtraction of integrated areas for ¹⁹⁵Pt signal on unspiked blank tissue. Application of calibration to two replicates for the analyzed tissue sections of rat kidneys treated with cisplatin allowed the estimation of total Pt amounts in the whole kidney slices. 35 and 42 ng Pt were calculated for the 16 mg kg⁻¹ cisplatin slices, while 2 and 7 ng Pt were obtained for the 5 mg kg⁻¹ cisplatin slices, showing the good reproducibility of the method. Considering the tissue slices weights, average contents of 14 and 144 μg Pt/g tissue were estimated for the 5 mg kg⁻¹ cisplatin and the 16 mg kg⁻¹ cisplatin kidneys, respectively. The limit of detection (3 s of unspiked tissue of droplet size) for Pt in a certain tissue volume (circle at 170 μm diameter in a 3 μm thin tissue section) was calculated as 50 fg. This excellent sensitivity can be due to the very good stability of the system, and points out again the good analytical features of this methodology for elemental bioimaging.

Evaluation of Renal Damage during Cisplatin Treatments.

Prior to the study of the Pt distribution in kidney, it should be determined if renal damage takes place and its extent, in order to assist on the interpretation of elemental bioimages. Cisplatin significantly increased serum BUN and creatinine levels, urinary volume (due to the effect of cisplatin on the expression of water channels—aquaporins—along the nephron²⁸), and protein excretion in comparison with the controls at day 5 (Table 1), proving renal damage. The toxic effect of cisplatin was also confirmed by the detection of morphologic abnormalities in kidney slices. As shown in Figure 2, the healthy control cortex histology (Figure 2a) is altered after administration of 5 mg kg⁻¹ cisplatin, where tubule swelling, loss of brush border membrane, epithelial vacuolization, hyaline casts (protein aggregates) and cell debris detachment can be observed (Figure 2b and c). Structural damage caused by cisplatin takes place in cortical tubule cells, especially in RPTECs, this effect being dose-dependent (not shown). This damage is also reflected in the medulla (Figure 2d), where protein casts are observed even if no significant intrinsic damage to the medulla cells is observed under cisplatin treatment.

Pt, Cu, and Zn Bioimages and Their Connection with Cisplatin-Induced Renal Damage. A control sagittal kidney section was analyzed by LA-ICP-MS to examine the Pt, Cu, and Zn distributions in a healthy untreated rat, as shown in Figure 3, as a comparative reference for the following study of their distribution under treatment with cisplatin. Figure 3a shows the microphotograph for an HE-stained parallel slice which

allows discerning the location of the cortex and medulla in the sample. As can be seen, no significant Pt signal (around 200 cps ^{195}Pt for the blank tissue, with a substrate background of 100 cps

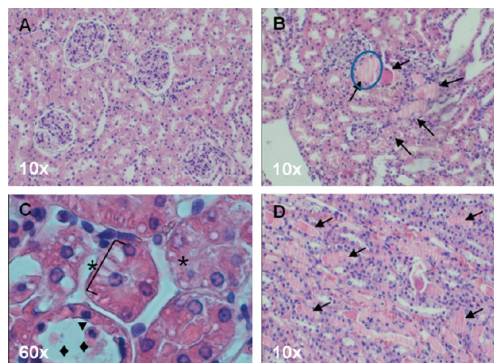


Figure 2. Histopathological study of HE-stained rat kidney sections for the evaluation of cisplatin-induced renal damage. A: control, cortex (10 \times); B: cisplatin 5 mg kg $^{-1}$, cortex (10 \times); C: detail of proximal tubules damage in cortex (60 \times); D: cisplatin 5 mg kg $^{-1}$, medulla (10 \times). Renal damage indicators are symbolized: \rightarrow : Protein casts are visualized as pink-stained cylinders inside the tubules lumen, \blacklozenge : Cellular fragments detachment to the tubules lumen, \blacktriangledown : Brush border membrane loss from proximal tubule epithelial cells, $*$: Vacuolization (accumulation of white rounded vesicles) in the cells cytoplasm. An example of tubule swelling is also marked with a blue circle. Cell nuclei appear stained in blue, while most other cell components are pink-stained.

found in the glass slide) was detected (Figure 3b). On the other hand, a clear accumulation of Cu in the cortex could be observed (Figure 3c). One reason could be the fact that Cu(I) influx and efflux to the cells is mediated by CTR1 and ATP7A/ATP7B transporters, respectively, being the CTR1 transporter highly expressed at the basolateral cell membranes of the cortical renal tubules.²⁹ Moreover, Zn seems to be highly accumulated in the medulla (papilla) but also in some parts of the cortex (Figure 3d), being the Zn intake (through SLC39 transporters) and efflux (by using ZnT transporters) from the cells³⁰ quite different to the described mechanisms for Cu.

Figure 3 also shows the Pt, Cu, and Zn distributions obtained by LA-ICP-MS in kidney sagittal sections from rats treated with either 5 or 16 mg kg $^{-1}$ bw cisplatin, along with the microphotographs for HE-stained parallel slices. As can be seen, the highest ^{195}Pt signals are clearly located in the inner cortex and corticomedullary junction (Figure 3f and j), but also extends to the renal columns in the case of the high cisplatin dose (16 mg kg $^{-1}$). As expected, the Pt signals are about 1 order of magnitude lower for the 5 mg kg $^{-1}$ -administered rat. This could be due to the lower cisplatin concentration used in addition to the longer elapsed time between the administration and the rats sacrifice (5 days vs 3 days). Remarkably, the Pt intensity is considerably lower in the medulla as compared to the cortex (about 1 order of magnitude), particularly in the areas that clearly correlate with the medullar renal pyramids. This trend is in agreement with the fact that renal damage takes place mainly in the proximal tubule and to a lower extent, in the distal nephron⁶ due to high platinum

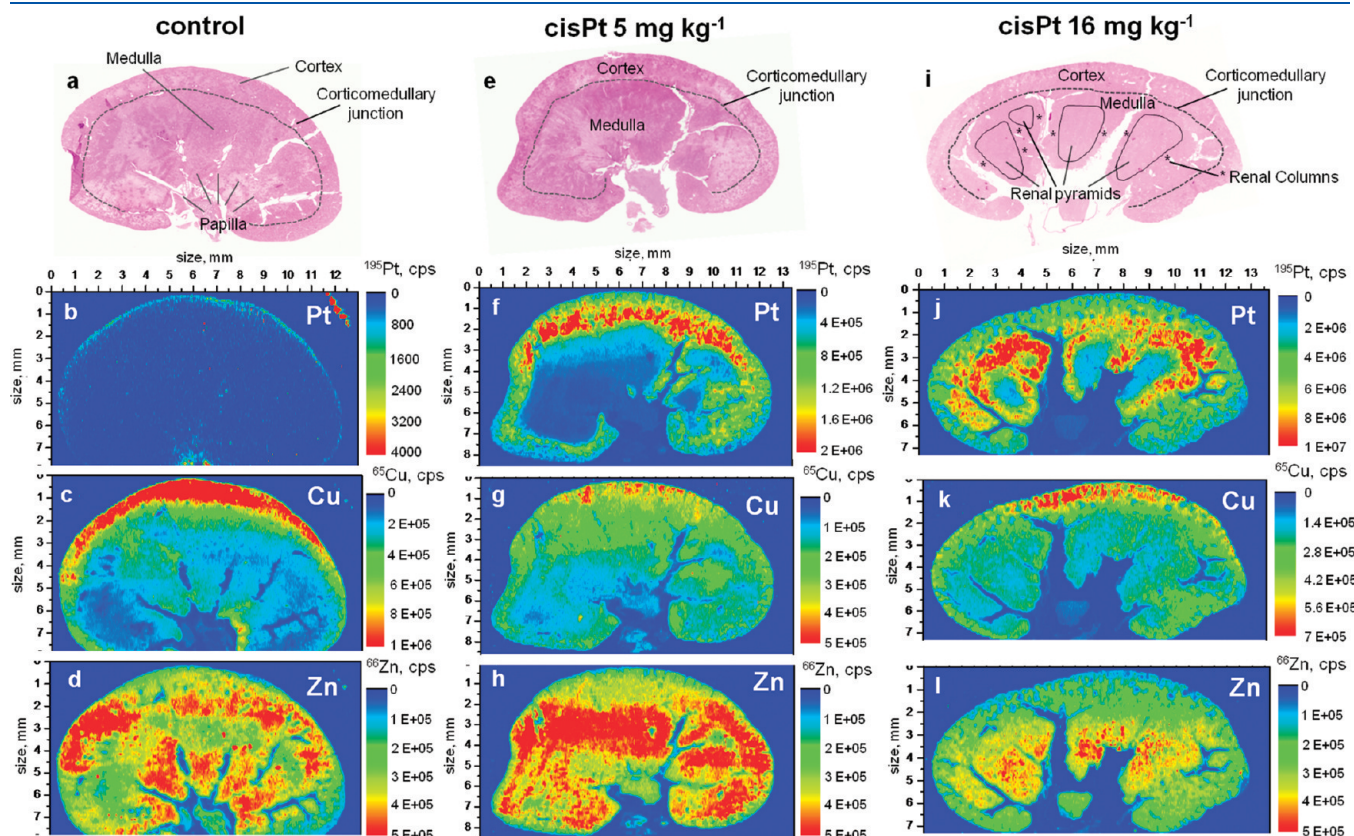


Figure 3. LA-ICP-MS images for the simultaneous monitoring of ^{195}Pt (b, f, and j), ^{65}Cu (c, g, and k), and ^{66}Zn (d, h, and l) on sagittal sections from kidney from control rats (b, c, and d) and rats treated with a single dose of either 5 (f, g, and h) or 16 mg kg $^{-1}$ cisplatin (i, j, and k). HE-stain photographs for parallel sections, indicating the cortex, medulla, corticomedullary junction (dotted lines), renal pyramids and renal columns (represented with an asterisk) are shown in a, e, and i, corresponding to the control, the 5 mg kg $^{-1}$ or 16 mg kg $^{-1}$ cisplatin samples, respectively.

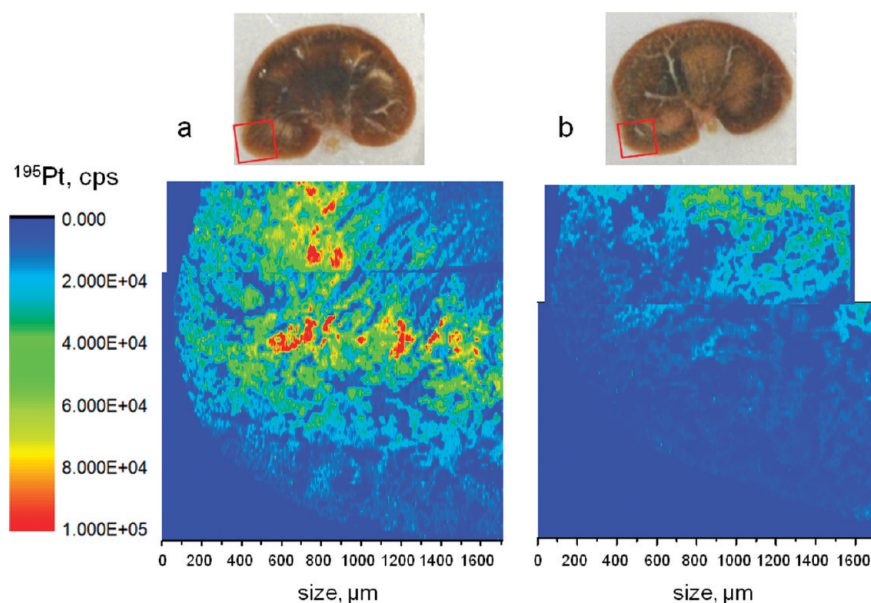


Figure 4. High resolution LA–ICP–MS images for ^{195}Pt monitoring on selected cortical areas on sagittal kidney sections from rats treated with (a) cisplatin 5 mg kg^{-1} , and (b) cisplatin 5 mg kg^{-1} + cilastatin 150 mg kg^{-1} day, sacrificed after 5 days. Photographs of both kidneys with a red square indicating the selected analyzed areas are also presented.

accumulation, but not significantly in the medulla. Cisplatin excretion takes place mainly by glomerular filtration and to a lesser extent by secretion in the nephron. As stated before, proximal and distal tubules, located in the cortex and corticomedullary junction, present with a high degree of expression the copper transporter CTR1, which has been demonstrated to participate too in the cisplatin uptake to the tubular cells and, therefore, in its accumulation.²⁹ In addition to this, the organic cation transporter OCT2 is also highly expressed at the basolateral membrane of RPTECs and has turned out to be a critical transporter for cisplatin nephrotoxicity.³¹ On the other hand, RPTECs present a brush border at the apical membrane, where lipid rafts can redirect cisplatin from the glomerular filtrate in the tubule lumen into the tubule cells through pinocytosis, contributing to Pt accumulation in proximal tubules. Interestingly, in distal tubule cells no brush border membrane is found and the degree of expression of OCT2 is lower as compared to proximal tubules. Therefore, it is reasonable to expect that the main Pt accumulation and damage occurs at the RPTECs, as observed in the histopathological examination. In particular, in light of the Pt images observed, the segment S3 from the proximal tubular cells, predominant at the corticomedullary junction and the renal columns, would be bearing the highest Pt accumulation. This fact is in accordance to previous observations in a rat kidney model, where cisplatin-induced cellular alterations and apoptosis were mainly found in the corticomedullary junction³² and also the higher Pt accumulation found *in vitro* in RPTECs lines from the S3 segment as compared to the S1 segment and collecting distal tubules, after cisplatin exposure.³³ In the medulla, the loop of Henle and the collecting tubule are located, which lack the high amount of Pt-transporters observed in the renal tubules, which explains the lower Pt accumulation detected.

On the other hand, considering the Cu distribution shown in Figure 3g and k, the metal accumulates to a higher extent at the cortical areas of the samples. A slightly more homogeneous distribution of the metal was found in the cisplatin-treated kidneys as

compared to the control sample (Figure 3c) and a slight decrease in the Cu signal when cisplatin was administered was detected, in accordance to previous observations,³⁴ especially in the cortex. This may be due to the fact that Cu and cisplatin share the cell influx pathway by CTR1 and efflux by ATP7A and ATP7B,³⁵ being Cu and Pt competitive toward the transporters. Considering that CTR1 expression in kidney was reported to remain unaltered by cisplatin,²⁹ it is reasonable to postulate that Cu is displaced by Pt to some extent. On the other hand, Zn accumulation (Figure 3h) in kidney for the 5 mg kg^{-1} cisplatin-treated rat, presents slight differences compared to the control sample (Figure 3d), being somewhat more homogeneously distributed in the tissue. In the case of the 16 mg kg^{-1} cisplatin-treated rat (Figure 3l), a remarkably lower signal for Zn is observed at the cortex, in comparison to the control sample, being accumulated mainly in the medulla and papilla, instead. Although the Pt and Zn transporters are different, cisplatin might be able to displace Zn from the cells to some extent too in accordance to previous results,³⁴ especially from the corticomedullary region where Pt was found to mainly accumulate. In this regard, Pt has been proved to be able to displace Zn bound to proteins, as in the case of metallothioneins, due to their similar ionic radii.³⁶ Noteworthy, after cisplatin treatment, the maximum Cu, Zn, and Pt accumulation areas in the kidney seem to occupy complementary parts in the tissue, reflecting the displacement of Cu and Zn by Pt and the different transport mechanisms of the elements. Remarkably, although Cu and Zn are endogenous elements, Pt accumulation, exogenously incorporated for the cisplatin-treated rats at pharmacologically relevant doses and after a 5 day elimination period, is considerably higher than Cu and Zn.

Platinum Bioimaging for the Evaluation of Cilastatin As a Nephroprotector. The bioimaging methodology described herein was also used to evaluate the protective effect of cilastatin on cisplatin nephrotoxicity in a rat model. Cilastatin is a ligand of renal dehydropeptidase I (DHP-I), located in the brush border apical membrane of RPTECs, which inhibits lipid rafts internalization

and therefore reduces apical entry of cisplatin and other drugs into these cells.^{23,37} First, nephroprotection induced by cilastatin was monitored by comparing the renal damage-indicating parameters obtained for the rats treated with 5 mg kg⁻¹ cisplatin with or without 150 mg kg⁻¹ day cilastatin and the control groups. As can be seen in Table 1, the increase in creatinine and BUN levels was significantly reduced by cilastatin. On the other hand, restoration to normal values of urine volume and proteinuria were also achieved. Histological examination of a section of a kidney from a rat treated with both the drug and the protector (SI Figures S-3a and S-3b, cortex and medulla, respectively) allowed observing less tubule damage and less protein casts than in the cisplatin-treated animal (Figure 2b and d), confirming the considerable renal protection due to cilastatin.

Considering that Pt-accumulation takes place mainly in the cortex, it is of particular interest to focus on this area during the study of nephroprotective strategies. Comparison of Pt accumulation after cisplatin treatment alone or combined with cilastatin was made by LA–ICP–MS analysis in selected regions comprising the cortex and corticomedullary junction from kidneys from groups A3 and A4. High resolution images for ¹⁹⁵Pt monitoring were obtained by performing line scans at 25 μm spot size (single line width in the tissue: 18 μm), 25 μm s⁻¹ scan rate, which are displayed in Figure 4. As can be seen, a considerable decrease in Pt signal was observed in the cortical area analyzed when cisplatin was coadministered with cilastatin (Figure 4b) as compared to the cortex from the cisplatin-treated rat (Figure 4a). The results are in good agreement with those previously reported where total Pt accumulated in the cortex after 5 days from cisplatin administration was reduced about 22% under the presence of cilastatin, this not being the case of the medulla, where no significant variation in Pt accumulation was observed.²⁴ The blocking of the pynocytosis cell entrance pathway induced by cilastatin in proximal tubules might result in the decrease of Pt accumulation and would be clearly in correlation with the cilastatin-induced protective effect observed. Moreover, evidence on the blocking of extrinsic apoptotic mediators has also been found to be induced by cilastatin, probably contributing to the whole nephroprotective effect.²⁴ Importantly, the effect induced by cilastatin was previously found to be exclusive for RPTECs, which include a brush border linked DHP-I,²³ and therefore presents itself as a powerful candidate for nephroprotective therapies which may not alter cisplatin antitumor efficacy.

CONCLUSIONS

A methodology based on the use of LA–ICP–MS has been investigated and applied for elemental imaging of kidney tissues from rats treated with cisplatin. The use of ultrathin tissue slices is a key factor for a very high resolution and sensitivity in the images, allowing a high contrast in the final metal image in the tissues. The kidney maps obtained permit discerning Pt preferential accumulation in the cortex and corticomedullary regions, coinciding with the epithelial cells in the S3 segments in the proximal tubule, which is in connection with the renal damage observed therein. Moreover, Cu and Zn distributions were also measured, showing a decrease in the accumulation levels under the presence of Pt, probably due to their displacement from the renal cells. On the other hand, the usefulness of this methodology has been proved for the in vivo study of the protection produced by cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity. Reduced Pt accumulation levels in kidney cortex after cotreatment with cilastatin

was proven and may be directly related to the protective effect observed in histological studies and renal damage-indicating biochemical parameters.

Overall, the excellent capabilities of this methodology allowed visualizing the long-term accumulation maps for Pt, Cu, and Zn in kidney from rats treated with pharmacological doses of cisplatin with an exceptional resolution, making possible to discern the particular location of the elements in relation to the histology of the tissue. The potential of this analytical methodology for obtaining biological relevant information even at the microscopic scale was proven and will be exploited in future studies.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34 91-394-51-46. Fax: +34 91-394-43-29. E-mail: mmgomez@quim.ucm.es.

ACKNOWLEDGMENT

E.M.-G. and C.G. contributed equally to this work. The use of cilastatin as a renal protector against toxic injuries is under patent (PCT International Application No. ES2008/070137). This work was financially supported by the Spanish CICYT Project CTQ-2008-04873, Fundación Mutua Madrileña and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS-PI08/1481). We are grateful to Dr. Thomas Mairinger and Lina Khoury for kindly facilitating tissue sectioning and staining at the Pathology Laboratory at Helios Klinikum Emil von Behring (Berlin, Germany); and Merck Sharp and Dohme (Spain) for providing cilastatin.

REFERENCES

- (1) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- (2) Lippard, S. J.; Todd, R. C. *Metallomics* **2009**, *1*, 280–291.
- (3) Galanski, M.; Arion, V. B.; Jakupc, M. A.; Keppler, B. K. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2078–2089.
- (4) Cepeda, V.; Fuertes, M. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Quevedo, C.; Perez, J. M. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 3–18.
- (5) Esteban-Fernandez, D.; Moreno-Gordaliza, E.; Canas, B.; Palacios, M. A.; Gomez-Gomez, M. M. *Metallomics* **2010**, *2*, 19–38.
- (6) Rabik, C. A.; Dolan, M. E. *Cancer Treat. Rev.* **2007**, *33*, 9–23.
- (7) Pabla, N.; Dong, Z. *Kidney Int* **2008**, *73*, 994–1007.
- (8) Esteban-Fernandez, D.; Verdaguier, J. M.; Ramirez-Camacho, R.; Palacios, M. A.; Gomez-Gomez, M. M. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 140–146.
- (9) Yao, X.; Panichpisal, K.; Kurtzman, N.; Nugent, K. *Am. J. Med. Sci.* **2007**, *334*, 115–124, DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e.
- (10) Rosenzweig, A. C. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 673–677.
- (11) Fletcher, C. D. M. *Churchill Livingstone*, 3 edn., 2007.
- (12) Qin, Z.; Caruso, J. A.; Lai, B.; Matusch, A.; Becker, J. S. *Metallomics* **2011**, *3*, 28–37.
- (13) Zvyagin, A. V.; Zhao, X.; Gierden, A.; Sanchez, W.; Ross, J. A.; Roberts, M. S. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 064031.
- (14) Kusakabe, T.; Nakajima, K.; Suzuki, K.; Nakazato, K.; Takada, H.; Satoh, T.; Oikawa, M.; Kobayashi, K.; Koyama, H.; Arakawa, K.; Nagamine, T. *Biometals* **2008**, *21*, 71–81.

- (15) Cazares, L.; Troyer, D.; Wang, B.; Drake, R.; John Semmes, O. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 17–27.
- (16) Becker, J. S.; Zoriy, M.; Matusch, A.; Wu, B.; Salber, D.; Palm, C.; Becker, J. S. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 156–175.
- (17) Chery, C. C.; Gunther, D.; Cornelis, R.; Vanhaecke, F.; Moens, L. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3305–3313.
- (18) Hare, D.; Burger, F.; Austin, C.; Fryer, F.; Grimm, R.; Reedy, B.; Scolyer, R. A.; Thompson, J. F.; Doble, P. *Analyst* **2009**, *134*, 450–453.
- (19) Becker, J. S.; Zoriy, M. V.; Pickhardt, C.; Palomero-Gallagher, N.; Zilles, K. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3208–3216.
- (20) Becker, J. S.; Breuer, U.; Hsieh, H. F.; Osterholt, T.; Kumtabtim, U.; Wu, B.; Matusch, A.; Caruso, J. A.; Qin, Z. Y. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9528–9533.
- (21) Zoriy, M.; Matusch, A.; Spruss, T.; Becker, J. S. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260*, 102–106.
- (22) Pugh, J. A. T.; Cox, A. G.; McLeod, C. W.; Bunch, J.; Whitby, B.; Gordon, B.; Kalber, T.; White, E. J. *Anal. At. Spectrom.*, **2011**.
- (23) Camano, S.; Lazaro, A.; Moreno-Gordaliza, E.; Torres, A. M.; de Lucas, C.; Humanes, B.; Lazaro, J. A.; Gomez-Gomez, M. M.; Bosca, L.; Tejedor, A. J. *Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *334*, 419–429.
- (24) Humanes, B.; Lazaro, A.; Camano, S.; Moreno-Gordaliza, E.; Lazaro, J. A.; Lara, J. M.; Ortiz, A.; Gomez-Gomez, M. M.; Martín-Vasallo, P.; Tejedor, A. submitted.
- (25) Gallego-Delgado, J.; Lazaro, A.; Gomez-Garre, D.; Osende, J. I.; Gonzalez-Rubio, M. L.; Herraiz, M.; Manzarbeitia, F.; Fortes, J.; Fernandez-Cruz, A.; Egido, J. *J. Nephrol* **2006**, *19*, 588–98.
- (26) Giesen, C.; Mairinger, T.; Khoury, L.; Waentig, L.; Jakubowski, N.; Panne, U. *Anal. Chem.* **2011**, DOI: 10.1021/ac2016823.
- (27) Austin, C.; Hare, D.; Rozelle, A. L.; Robinson, W. H.; Grimm, R.; Doble, P. *Metallomics* **2009**, *1*, 142–147.
- (28) Kim, S. W.; Lee, J. U.; Nah, M. Y.; Kang, D. G.; Ahn, K. Y.; Lee, H. S.; Choi, K. C. *J. Am. Soc. Nephrol* **2001**, *12*, 875–882.
- (29) Pabla, N.; Murphy, R. F.; Liu, K.; Dong, Z. *Am. J. Physiol., Renal Physiol.* **2009**, *296*, F505–F511.
- (30) Colvin, R. A.; Holmes, W. R.; Fontaine, C. P.; Maret, W. *Metallomics* **2010**, *2*, 306–317.
- (31) (a) Ciarimboli, G.; Ludwig, T.; Lang, D.; Pavenstädt, H.; Koepsell, H.; Piechota, H.-J.; Haier, J.; Jaehde, U.; Zisowsky, J.; Schlatter, E. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 1477–1484. (b) Ciarimboli, G. *Platinum Other Met. Coord. Compd. Cancer Chemother.* **2009**, 353–358.
- (32) Sheikh-Hamad, D.; Cacini, W.; Buckley, A.; Isaac, J.; Truong, L.; Tsao, C.; Kishore, B. *Arch. Toxicol.* **2004**, *78*, 147–155.
- (33) Kroning, R.; Katz, D.; Lichtenstein, A. K.; Nagami, G. T. *Br. J. Cancer* **1998**, *79*, 293–299.
- (34) Sharma, R. P. *Pharmacol. Res. Commu.* **1985**, *17*, 197–206.
- (35) Yonezawa, A.; Inui, K.-i. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 563–568.
- (36) Esteban-Fernandez, D.; Canas, B.; Pizarro, I.; Palacios, M. A.; Gomez-Gomez, M. M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1113–1121.
- (37) Perez, M.; Castilla, M.; Torres, A. M.; Lazaro, J. A.; Sarmiento, E.; Tejedor, A. *Nephrol., Dial., Transplant.* **2004**, *19*, 2445–2455.

Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies

Estefanía Moreno-Gordaliza^{1*}, Charlotte Giesen^{2,3*}, Alberto Lázaro⁴, Diego Esteban-Fernández³, Blanca Humanes⁴, Benito Cañas¹, Ulrich Panne^{2,3}, Alberto Tejedor⁴, Norbert Jakubowski² and M. Milagros Gómez-Gómez^{1#}

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain.

² BAM Federal Institute for Materials Research & Testing, Richard-Willstätter Str. 11, 12489, Berlin, Germany

³ Department of Chemistry, Humboldt-Universität zu Berlin, Brook-Taylor Str. 2, 12489 Berlin, Germany

⁴ Renal Pathophysiology Laboratory, Department of Nephrology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo 46, 28007, Madrid, Spain

*Both authors contributed equally

#Corresponding author: M.M. Gómez-Gómez. E-mail: mmgomez@quim.ucm.es. Fax: +34 91-394-43-29; Tel: +34 91-394-51-46

SUPPORTING INFORMATION

The present document provides further information on the paper mentioned above.

Contents:

- Figures S-1 to S-3

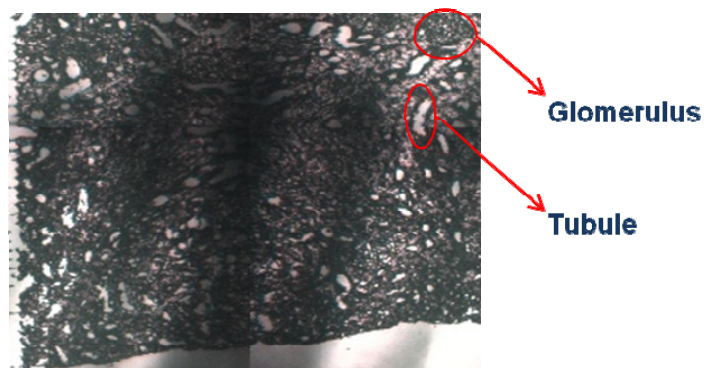


Figure S-1. Microphotograph of the cortical selected area from a kidney from a rat treated with 5 mg kg^{-1} cisplatin, prior to LA-ICP-MS analysis at $8 \text{ }\mu\text{m}$ spot size and $10 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ scan speed, as shown in Figure 1e. Glomeruli and tubules can be discerned as marked in red.

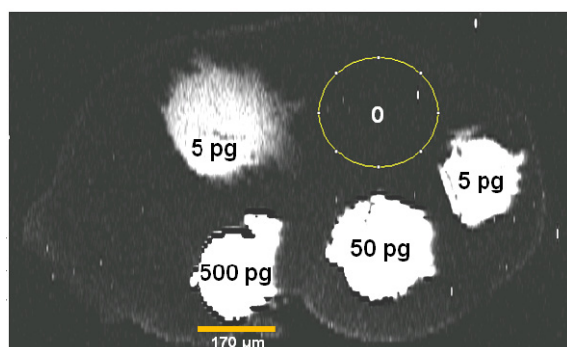


Figure S-2. Control rat kidney tissue spiked with $0.5 \text{ }\mu\text{L}$ of 1000 , 100 , and $10 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ($n=2$) Pt standard solutions. The ^{195}Pt signals from LA-ICP-MS imaging from the spiked and unspiked areas marked in white and yellow, respectively, were integrated using ImageJ software.

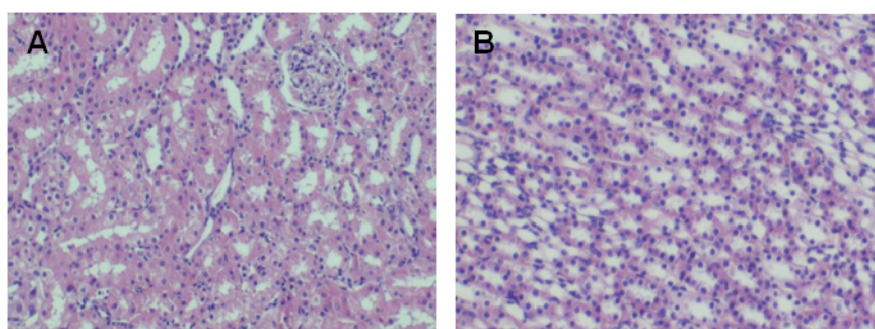


Figure S-3. Microscope images for an HE-stained kidney section from a rat treated with cisplatin 5 mg kg^{-1} + 150 mg kg^{-1} day cilastatin for the evaluation of the latter as a nephroprotector for cisplatin. **A:** Cortex; **B:** Medulla. $10\times$ magnification was employed. Cell nuclei appear stained in blue, while most other cell components are pink-stained. A clear protection was obtained in light of the normal histology observed.

IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA

IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA

El objetivo fundamental de este trabajo fue el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de platino elemental y su especiación en muestras biológicas tras el tratamiento con cisplatino, con objeto de profundizar en su mecanismo de acción y toxicidad, y con el fin de aportar información para contribuir al desarrollo de terapias antitumorales mejoradas. A lo largo de él se ha mostrado la importancia de los métodos analíticos en estudios multidisciplinarios de las áreas médica y bioquímica. En esta sección se efectúa una discusión que engloba todos los resultados obtenidos en los trabajos anteriormente presentados.

Estrategias de espectrometría de masas “top-down” y “bottom-up” para la identificación de proteínas ligadas a platino y la determinación de sus puntos de coordinación

En esta tesis se planteó el desarrollo de una metodología que permitiera la identificación de proteínas que interaccionan con cisplatino en muestras biológicas, que abordara problemas como la gran complejidad de las muestras, que suelen presentar miles de proteínas diferentes, además del hecho de que los analitos de interés platinados se encuentran en bajas concentraciones. De esta forma, se han de utilizar técnicas de elevada sensibilidad para la detección de dichas especies y aplicar métodos de separación que proporcionen una resolución adecuada. Para el desarrollo de la metodología se emplearon proteínas modelo (insulina, citocromo c, mioglobina, albúmina o transferrina) que, cuando son incubadas con cisplatino, en un medio similar al fisiológico, tienen la capacidad de interaccionar con el fármaco.

Para afrontar el estudio de proteínas platinadas, será necesario aplicar alguna de las aproximaciones proteómicas basadas en espectrometría de masas “bottom-up” o “top-down”. El empleo de insulina platinada como modelo sirvió para comparar detalladamente las dos aproximaciones respecto a su aplicabilidad para la caracterización de proteínas con platino, como se recogió en los **trabajos 2 y 3**. Por un lado, se demostró que una forma sencilla para comprobar la formación de complejos Pt-proteínas en las incubaciones es el empleo de la técnica acoplada SEC-ICP-MS, lo que permitió la detección sensible de la formación de especies de insulina unidas a Pt, como se comprobó en el **trabajo 2**. Además se efectuó una comparación entre los dos métodos de ionización en espectrometría de masas molecular más utilizados en el análisis de biomoléculas, MALDI y ESI. Se demostró que, aunque MALDI posibilita una preparación de muestra y análisis más sencillo y rápido que ESI, éste último permite una mejor

conservación de los enlaces Pt-proteínas y de la identidad de los aductos. Se comprobó que los ligandos asociados al platino tienden a perderse con más facilidad durante la ionización con MALDI, mientras que ESI los mantiene en gran extensión. De manera que, en general, parece más apropiado ESI para el análisis de estos compuestos. Así, mediante ESI pudo estudiarse la identidad de las especies platinadas formadas durante la incubación de insulina con cisplatino, que experimentaban diferencias en función del tiempo y medio de incubación, observándose especies de 1 y hasta 2 ó 3 átomos de platino ligados a la proteína, lo que apunta a diversos puntos de unión posibles en la proteína. En cuanto a las diferencias encontradas en los modos de coordinación en función del medio de incubación, se constató que el aducto mayoritario observado en condiciones fisiológicas presenta el residuo $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, coordinándose la insulina de forma bidentada, posiblemente a través del residuo de un aminoácido y del N desprotonado del enlace peptídico contiguo. Contrariamente, en un medio de incubación ácido, la desprotonación del grupo NH está desfavorecida, por lo que se observa mayoritariamente un aducto $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$ ligado a la proteína de forma monodentada.

Por otro lado, la proteína debe ser lo suficientemente pequeña como para distinguir durante su análisis por MS molecular el perfil isotópico modificado por platino, que será un patrón fundamental de reconocimiento y que presentará cada vez menor influencia según aumente el tamaño de la proteína. En el caso de la insulina (5.6 kDa), se comprobó que esto puede conseguirse utilizando un instrumento de resolución media como una trampa de iones lineal en modo ultrazoom. Sin embargo, el perfil isotópico de otra proteína como el citocromo c (12 kDa) puede sólo resolverse utilizando un instrumento de alta resolución como un FT-ICR, aunque se comprobó que distinguir la presencia de platino se hace extremadamente complicado debido a la gran contribución del carbono al perfil isotópico. De hecho, la imposibilidad de reconocer el perfil isotópico modificado puede ser una desventaja, paliable sólo en el caso de que lo que se busque sea la presencia o ausencia de Pt en una proteína concreta, con Mr conocido, donde sólo la diferencia de masas entre la forma platinada y no platinada pueda ser informativa en sí misma. Por ejemplo, en el caso de citocromo c o mioglobina (17 kDa) incubados con excesos molares de cisplatino de 10 veces en condiciones fisiológicas, llegaron a distinguirse mediante nESI-LTQ MS aductos con 1 y 2 átomos de Pt en el caso de CYT C, y con 1, 2 ó 3 átomos de platino para la mioglobina, encontrándose $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ y $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ como residuos platinados mayoritarios coordinados a CYT C y MYO, respectivamente, aunque existen diversas poblaciones de otros aductos minoritarios tanto bi- como monodentados. No obstante, en el caso de HSA (67 kDa) y TF (79 kDa) incubadas con cisplatino en las mismas condiciones

que CYT C y MYO, utilizando un LTQ tan sólo pudieron observarse cambios promedio en sus masas debido a su elevado tamaño (resultados no mostrados).

Como se vio también en el **trabajo 2**, la fragmentación directa por CID-MSⁿ de los aductos platinados de una proteína como la insulina (alrededor de 6 kDa) durante su análisis por nESI-LTQ, permitió encontrar puntos de unión del platino a la misma, confirmando la posibilidad de la obtención de información estructural fiable con esta estrategia. Sin embargo, hay que tener presente que el elevado tamaño de una proteína, su alto estado de carga, y la presencia de puentes disulfuro en la estructura dificultan la interpretación de los espectros de fragmentación (con multitud de fragmentos con diversos estados de carga y en numerosas ocasiones, ofreciendo un grado limitado de secuencia), afectando negativamente a la localización de los puntos de coordinación. Para dicha localización, es importante la identificación de fragmentos platinados en el espectro de MS/MS, y para ello es ventajoso distinguir sus perfiles isotópicos, lo cual sería extremadamente complicado para iones de elevada masa y carga. En el caso de la insulina, aunque la presencia de puentes disulfuro complica y limita su secuenciación, al tratarse de una proteína pequeña pudieron asignarse numerosos fragmentos, algunos de ellos con platino, permitiendo mediante sucesivos experimentos MSⁿ elucidar varios puntos de unión, independientemente del medio de incubación (N-terminal, His 5, Cys 7, His 10/Cys 19 de la cadena B).

Sin embargo, en el **trabajo 3** se comprobó que cuando se llevan a cabo digestiones enzimáticas sobre los complejos platinados para producir péptidos se consigue un mayor grado de información estructural a partir de sus espectros de fragmentación, dado que se facilita la interpretación de los mismos. En el caso de la insulina, se encontró un mayor número de posibles puntos de coordinación a la proteína, dado que la simplificación del sistema hizo posible hallar puntos de unión minoritarios (Cys 6/ Cys 7, Cys 20 de la cadena A, además de los anteriormente propuestos en la aproximación “*top-down*”). Además se demostró que los enlaces Pt-insulina resisten los tratamientos implicados en la digestión en disolución convencional (8 M urea, 10 mM DTT, 55 mM IAA en tampón 50 mM Tris pH 7.8), dando lugar a péptidos con platino fácilmente detectables en base a su perfil isotópico modificado, independientemente del tamaño de la proteína de la que deriven. Sin embargo, al generarse diversas poblaciones de distintos péptidos aumenta la complejidad de la muestra y se produce la ionización competitiva de estos. Esto hace que sea necesaria su separación cromatográfica previa a su detección mediante ESI-MS, especialmente en el caso de proteínas grandes, y particularmente para la detección de péptidos minoritarios platinados, que además pueden presentar una ionización dificultada. Así en el caso de proteínas pequeñas incubadas con cisplatino, como la insulina, el CYT C o MYO,

realizando una infusión directa de los digeridos mediante nESI-LTQ MS, pudieron detectarse péptidos con platino, no así en el caso de CA, HSA o TF, para las cuales sólo se consiguió la detección de péptidos con platino con ESI-MS tras su separación cromatográfica, como se demostró en el **trabajo 5**.

Otro aspecto a tener en cuenta durante la digestión enzimática es cierta tendencia a la pérdida de ligandos asociados al platino, al producirse el desplegamiento de las proteínas y la posible aparición de puntos adicionales en éstas, en vista de los péptidos observados durante la digestión de complejos platinados de insulina, los cuales sólo mantienen un ligando NH_3 de los que presentaban originalmente en los aductos proteicos. También podría ocurrir un intercambio de algunos ligandos originales por otros presentes en el medio de digestión, tales como el Tris o ligandos CN, como consecuencia del uso de ACN durante las digestiones en gel, como se vio en el **trabajo 5**. Por ejemplo, en el caso del citocromo c, se observó mediante nESI un péptido (EETLMEYLENPK) con un residuo $[\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{Tris}]^{2+}$ durante su digestión en disolución, mientras que durante su digestión en gel se detectó otro péptido diferente (MIFAGIK) con un residuo $[\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{CN}]^+$.

Durante los ensayos realizados mediante nESI con infusión directa, se comprobó que el empleo de extracción en fase sólida en puntas de micropipeta, con rellenos de C_4 o C_{18} (como los ZipTips o los OMIX) es adecuado para el desalado y preconcentración de especies proteicas o peptídicas con Pt, proporcionando una buena recuperación de las especies y facilitando el cambio a un disolvente adecuado para su análisis.

En cuanto a los métodos de fragmentación de iones en espectrometría de masas, en el **trabajo 3** se comprobó que la activación por CID es adecuada para la localización de puntos de coordinación de Pt a nivel de péptidos. Sin embargo, en ciertas ocasiones favorece la pérdida de moléculas neutras durante la fragmentación, sobre todo en el caso de ligandos como NH_3 asociados al Pt en el ion precursor, de hecho muchos espectros muestran las pérdidas de estos ligandos NH_3 en las series de fragmentación. Empleando la opción de “*wideband activation*” durante la fragmentación pueden reducirse las pérdidas neutras en el precursor, dando lugar a fragmentos más intensos, aunque no se evita la pérdida de ligandos asociados al platino en los fragmentos generados. Esta pérdida de ligandos en los fragmentos puede plantear problemas en estudios posteriores de identificación de especies platinadas en muestras complejas mediante LC-MS automatizada mediante un motor de búsqueda. En estas búsquedas se introducirían las masas de los residuos modificados como modificaciones variables, lo que probablemente proporcionaría malos resultados debido a las bajas puntuaciones obtenidas derivadas de malas asignaciones de los fragmentos, y a errores elevados en la asignación de la masa de los iones

monoisotópicos precursores. No obstante, para efectuar una interpretación manual de los resultados, CID proporciona muy buenos resultados.

Por otro lado, el uso de ETD como método de fragmentación está indicado para el estudio de modificaciones postransduccionales, ya que no se favorece la pérdida de moléculas neutras lábiles. De hecho, en el caso de péptidos con platino, se observó que no se producía la pérdida de ligandos unidos originalmente al platino en los fragmentos. Sin embargo, durante la fragmentación con ETD se observaron incompletas las series c- y z- de los péptidos platinados, particularmente en la zona de bajas m/z, lo que origina una pérdida de información en el espectro de fragmentación y proporciona normalmente un pico de gran intensidad correspondiente al precursor en un estado de carga inferior. De manera que ETD no aporta más información que CID y presenta inconvenientes en cuanto a la localización de sitios de unión de platino en péptidos.

En cuanto a la posibilidad de acelerar la digestión triptica mediante el empleo de una sonda de ultrasonidos, las pruebas realizadas con el modelo de insulina platinada en el **trabajo 3** permitieron comprobar que se mantenían los péptidos con platino tras el proceso de digestión, encontrándose los mismos sitios de unión para el Pt en la proteína que cuando se aplicó la digestión en disolución convencional, reduciendo el proceso completo de 16 h a 5 min. Este mismo método se probó en un modelo de citocromo C incubado con cisplatino y permitió observar péptidos con platino. Sin embargo, para su aplicación en muestras reales sería necesaria una evaluación más exhaustiva más allá de estos resultados preliminares.

El estudio realizado sobre la reactividad de los residuos proteicos (**trabajo 3**), utilizando insulina como modelo, constató que la reactividad de las cisteínas libres (grupos tiol) frente a cisplatino es muy superior a la del resto de los aminoácidos, de forma que cuando éstas están presentes, el platino reaccionará preferentemente con éstas y una vez ocupados esos sitios, el platino ocuparía otros puntos secundarios. Sin embargo, se comprobó que cuando existen puentes disulfuro o grupos tioéter, el platino también puede reaccionar preferentemente con estos, aunque en este caso se establece una clara competencia con otros grupos como los NH₂ o los anillos imidazol de la histidina, de forma que reaccionará con estos dos tipos de dadores de electrones por N o S a igualdad de accesibilidad. A la luz de los resultados obtenidos para digeridos en disolución o en gel (**trabajo 5**) de proteínas estándar más complejas (TF, HSA, CA, MYO, CYT C) incubadas con cisplatino, parece que sólo cuando aparecen claras diferencias de accesibilidad a distintos grupos en la proteína (pueden existir grupos superficiales accesibles y otros internos menos accesibles, o involucrados en otros enlaces), podría establecerse una preferencia hacia determinados grupos accesibles, aun no siendo los más reactivos a priori.

Empleando modelos CPK de las estructuras tridimensionales de las proteínas, se pudo comprobar la comentada accesibilidad de los residuos encontrados como puntos de unión en éstas, permitiendo la interpretación de los resultados. En el caso de CYT C, el Pt se coordina principalmente a su residuo Met 65 superficial, estando sus Cys involucradas en la unión a un grupo hemo; mientras que en el caso de la mioglobina, lo hace principalmente a sus His, (His 113, His 116, His 119), al igual que la CA, que aloja al Pt en su región N terminal rica en residuos His (His 2/His 3, His 9/His 14), aun presentando otras His o Met en su cadena. En el caso de HSA y TF se encontraron diversos puntos de coordinación posibles, como Met 382 en la TF o His 288/Cys 289, Met 329 o His 338 en HSA. Es interesante resaltar que se comprobó que el platino puede coordinarse a cisteínas implicadas en puentes disulfuro (tanto en insulina como en HSA) y que incluso se observa la ruptura del enlace S-S catalizada por el Pt durante la incubación con cisplatino en medio ácido en el caso de insulina. Este hecho también puede tener lugar en condiciones neutras, a la luz de los resultados observados para el digerido en condiciones no reductoras de aductos de HSA con cisplatino.

A la vista de los resultados obtenidos, parece más apropiado afrontar la identificación de proteínas con platino en muestras biológicas complejas mediante la aproximación “*bottom-up*” ya que proporciona una caracterización estructural más exhaustiva. No obstante, la aproximación “*top-down*” presenta la ventaja de suponer un menor grado de tratamiento de la muestra, lo que reduce el riesgo de transformación de los aductos originales, además de informar mejor acerca del número de átomos de platino coordinables y el tipo de coordinación en función de los ligandos asociados al platino. Por lo tanto, en estudios futuros tampoco puede descartarse una combinación de estrategias “*top-down*” y “*bottom-up*”.

Determinación de proteínas ligadas a cisplatino en muestras biológicas mediante estrategias de separación multidimensionales basadas en electroforesis en combinación con MS atómica y molecular

En aras de desarrollar una metodología “*bottom-up*” para el estudio de mezclas complejas de proteínas, se planteó realizar separaciones proteicas de alta resolución mediante 2-DE. Las condiciones óptimas de separación que permitieran la conservación de los enlaces Pt-proteína se estudiaron con una mezcla de proteínas patrón incubadas con cisplatino. En el **trabajo 4** se comprobó mediante experimentos de centrifugación en filtros de corte y separaciones SDS-PAGE y OFFGEL que el empleo de condiciones desnaturalizantes (8 M urea o 2 % SDS, incluyendo otros reactivos como Tris, glicerol, azul de bromofenol o anfolitos) no

conducía a pérdidas significativas del platino ligado a proteínas. Sin embargo, el uso de reactivos con azufre como 5 % BME, 2.5 M tiourea, especialmente a tiempos largos de exposición y cuando se efectúa un tratamiento térmico, afecta significativamente al enlace cisplatino-proteínas y es recomendable no emplearlos.

Por otro lado, el uso de DTT (80 mM) como reductor también puede afectar ligeramente al enlace Pt-proteínas durante las largas separaciones electroforéticas OFFGEL. No obstante durante las digestiones en disolución en el **trabajo 3**, el tratamiento con 10 mM DTT y alquilación con 55 mM de IAA permitió observar péptidos de insulina con platino, mientras que durante los estudios efectuados en TF, HSA, CA, MYO y CYT C en el **trabajo 5**, estos tratamientos resultaron en efectos negativos para la conservación del enlace Pt-proteínas, especialmente durante la digestión en gel probablemente debido a que este proceso de digestión puede resultar en su conjunto más agresivo y puede ser más sensible al uso de este tipo de reactivos. De esta forma, parece que el grado de influencia de los reactivos es muy dependiente de su concentración, del tiempo y condiciones de exposición, de la cantidad de proteína, del grado de platinación y del tipo de grupos modificados. Así, aunque en general el empleo de reactivos con azufre puede ser perjudicial para la conservación de los enlaces platino-proteínas debido a su avidez por el Pt, es posible que en ciertas condiciones experimentales, fuese preferible su empleo. Esto es debido a que, por ejemplo, prescindir del uso de reductores afecta, como se comprobó, a la calidad de las separaciones electroforéticas e incluso al rendimiento de los procesos de digestión, lo cual puede traducirse en una menor concentración final de péptidos con platino, pudiendo provocar problemas en su detección. Sin embargo, parece recomendable trabajar en condiciones no reductoras para mantener el mayor número de aductos platinados. De hecho esto se demostró, por ejemplo, para la separación de proteínas citosólicas de riñón de rata tratada con cisplatino 5 mg kg⁻¹ mediante OFFGEL, para la que se obtuvieron mayores recuperaciones de platino tras la separación en condiciones desnaturalizantes no reductoras (prescindiendo del uso de tiourea y de DTT).

Por otra parte, se comprobó en los **trabajos 4 y 6** que la fijación de las proteínas separadas en el gel SDS-PAGE, seguida de la tinción mediante Coomassie o plata no parecen conducir a pérdidas significativas de los aductos Pt-proteínas. Sin embargo, puede producirse cierta pérdida por difusión a nivel superficial en el gel de las proteínas de bajo peso molecular durante las múltiples etapas involucradas en la tinción.

Para la detección de platino en las proteínas separadas en un gel SDS-PAGE, se optimizó un protocolo de mineralización de bandas de gel basado en el empleo de H₂O₂/HNO₃ y de evaporación con redisolución/evaporación con agua regia y HCl (**trabajo 4**) para la

determinación de platino total en dicho trozos de gel. Aunque este método permitió efectuar estudios de recuperación de platino durante la evaluación de las condiciones de separación más adecuadas en SDS-PAGE, resulta problemático debido a su baja resolución a la hora de afrontar la monitorización de proteínas con platino para su posterior identificación.

Por ello, se abordó el desarrollo de una metodología que aportara suficiente resolución espacial en la determinación de Pt ligado a proteínas aplicable tanto a los geles SDS-PAGE como 2-DE, mediante LA-ICP-MS (**trabajo 6**), para lo que se emplearon las proteínas patrón platinadas. En concreto, durante la comparación de las posibles estrategias para el tratamiento de los geles previo a su análisis, se comprobó que el secado de estos a 75 °C durante 2 h, tras el tratamiento con glicerol durante 2 min, es compatible con la conservación de los enlaces Pt-proteínas y proporcionó mejores resultados que en el caso del análisis sobre membranas de nitrocelulosa tras la electrotransferencia de las proteínas en el gel. Esta última estrategia permitiría en teoría concentrar las proteínas en la superficie delgada de la membrana, y por tanto aumentar la sensibilidad del método. No obstante, las pérdidas debidas a una incompleta transferencia proteica desde el gel, unidas a cierto grado de contaminación de la membrana debida a los electrodos de Pt de la celda de transferencia, produjeron en este caso particular mejores resultados en el caso del análisis de los geles secados, con intensidades de señal dos veces superiores y suponiendo un proceso de pretratamiento del gel más rápido y económico. A través de la ablación láser en sucesivas líneas paralelas a lo largo de un gel 2-DE y el procesado de las señales de platino obtenidas mediante ICP-MS con un programa como Origin, pudieron obtenerse imágenes sobre la distribución del platino en el gel. Un aspecto importante en las imágenes producidas es la optimización de parámetros del láser como la velocidad de barrido, el diámetro del haz, energía y frecuencia del láser, caudal de los gases transportadores; que tendrán influencia en la resolución y en la sensibilidad del método. En este caso se comprobó que el uso de He como gas transportador permite una transferencia más efectiva del material extraído mediante ablación láser hacia el plasma. Además, utilizando un diámetro de haz láser de 200 μm y una velocidad de barrido de 100 $\mu\text{m s}^{-1}$, es posible producir imágenes con suficiente resolución e intensidad para distinguir adecuadamente la distribución del elemento monitorizado en los spots de un gel bidimensional, pudiendo obtener una imagen completa en 5 h 30 min. En el caso de geles monodimensionales SDS-PAGE, resulta suficiente la ablación de una línea longitudinal a lo largo del centro de cada carril de muestra empleando las anteriores condiciones instrumentales, pudiendo obtenerse información elemental en un solo barrido de tan sólo 3 min.

Una ventaja que deriva de este método basado en el análisis directo de los geles es que no se produce la ablación de la totalidad del material barrido con el láser, de manera que, tras el

análisis de un gel completo, sigue existiendo una elevada cantidad de material disponible para realizar la digestión trípica en gel de las bandas o *spots* de interés y, por tanto, para su identificación por espectrometría de masas. Este hecho también supone que para la selección de *spots* o de bandas de gel con platino para su posterior identificación no es estrictamente necesaria la visualización de los *spots* mediante tinción del gel, ya que la información elemental obtenida mediante LA-ICP-MS es directamente trasladable a coordenadas en el gel analizado. De hecho, se comprobó que mediante LA-ICP-MS se pudieron producir mapas de distribución de platino en geles bidimensionales teñidos y sin teñir que mostraban una buena correlación con los *spots* de proteínas estándar platinadas.

Para la identificación de proteínas tras la detección de platino posterior a la 2-DE, es habitual su digestión en el gel, tras la cual los péptidos producidos se analizan mediante nLC-ESI-MS/MS. Sin embargo, en primer lugar, era necesario evaluar si el relativamente agresivo proceso de digestión en gel es apropiado para la conservación de los enlaces Pt-proteínas (**trabajo 5**). Empleando el modelo de proteínas estándar se comprobó que sometiendo a estas proteínas platinadas (TF, HSA, CA, MYO, CYT C) separadas mediante nrSDS-PAGE a un proceso convencional de digestión en gel excluyendo el empleo de reductores, es posible la detección posterior de péptidos con platino mediante nLC-ESI-LTQ-MS/MS, lo cual, a través de su fragmentación, llevó a la localización de sitios de unión en las correspondientes proteínas. Estos resultaron ser los mismos que los que se obtuvieron mediante digestiones en disolución en paralelo. De esta forma, esta es la primera vez que se llega a detectar péptidos con Pt resultantes de la digestión en gel de complejos Pt-proteínas. Esto supone que los aductos resisten tanto a disoluciones con 25-50 mM Tris o NH_4HCO_3 , a tratamientos con ACN, a disoluciones ácidas como 2% HCOOH , etc. Sin embargo, como se ha indicado, sería desaconsejable la inclusión de pasos de reducción de las proteínas con 10 mM DTT y alquilación con 55 mM IAA en el gel, a pesar de producir un incremento en el rendimiento de la digestión y en el recubrimiento de la proteína y de posibilitar el análisis en profundidad de puntos de unión en ella. No obstante, la omisión de la etapa de reducción de cistinas en las proteínas ricas en éstas hace que existan zonas proteicas a partir de las cuales no puedan generarse péptidos trípticos y por tanto, imposibilita la detección de puntos de coordinación de platino en esas regiones, como se observó para el caso particular de HSA y TF.

Una vez examinada y puesta a punto la metodología completa para el estudio de mezclas proteicas mediante la aproximación *bottom-up*, se planteó su aplicación para el estudio de muestras biológicas procedentes de tratamientos con cisplatino (**trabajo 6**). Por un lado, para poner a prueba la metodología se efectuó el estudio de proteínas con platino en suero sanguíneo

de una rata tratada con una dosis de cisplatino de 16 mg kg⁻¹ obtenido tres días después de la administración. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y visualizadas con Azul de Coomassie, y el Pt fue detectado mediante LA-ICP-MS en el gel. La digestión de bandas de gel donde se detectó platino y su análisis mediante nLC-ESI-MS/MS permitieron la identificación, entre otras, de proteínas mayoritarias del suero que son bien conocidas por reaccionar con el fármaco, como HSA, TF, α -2-macroglobulina e incluso hemoglobina, que se encontró presente como consecuencia de cierto grado de hemólisis durante la obtención del suero sanguíneo. Esto permitió corroborar que esta metodología permite la localización e identificación de proteínas con platino tras su separación electroforética.

Por otro lado, en el **trabajo 6** se abordó el estudio de proteínas con platino de un extracto citosólico de un cultivo celular de RPTECs de cerdo expuestas a cisplatino, dado su interés por ser objeto del daño renal causado por el fármaco. Las proteínas con platino se detectaron, tras su separación en un gel 2-DE, mediante LA-ICP-MS, creando un auténtico mapa de contorno del Pt-proteoma en el gel completo. Esto permite la detección del metal independientemente de la intensidad de los spots proteicos visualizados por cualquier método de tinción. De hecho, sirvió para comprobar que no existe una correlación entre la intensidad de proteínas y la de las señales de platino, y que, por tanto, existe cierta especificidad en la interacción de cisplatino con proteínas. Ésta también supone la primera aplicación en que se obtiene el mapa completo para un gel 2-DE correspondiente a un metaloproteoma. En este caso, se pudo llevar a cabo la identificación de múltiples proteínas correspondientes a los spots donde se detectó el platino. Sin embargo, no se consiguió su asignación inequívoca en base a la detección de péptidos con platino durante el análisis mediante nLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS de los digeridos, tras su búsqueda automatizada empleando el programa de búsqueda SEQUEST, con la introducción de las masas de los posibles residuos platinados como modificaciones variables. Además de los problemas expuestos asociados a las búsquedas automatizadas con SEQUEST en cuanto al reconocimiento de péptidos con platino, es posible que durante el análisis en el modo “*data dependent*” los péptidos con platino no fuesen seleccionados para ser fragmentados debido a la posible baja abundancia de estos péptidos en la muestra analizada. Debido a su especificidad y sensibilidad, el análisis en paralelo mediante μ LC(RP)-ICP-MS mostró la presencia en los spots digeridos de péptidos con platino, mientras que no resultó posible su detección con ESI-MS/MS.

La baja concentración de proteínas con platino que se encuentra cuando se trabaja con muestras biológicas (células o ratas) tratadas con cisplatino se traduce, después de múltiples procesos de separación y de tratamientos subsiguientes de la muestra, en una muy baja concentración de péptidos con platino, difícilmente detectables por las actuales técnicas de

espectrometría de masas molecular. Como es evidente, el desarrollo de técnicas de espectrometría de masas molecular de mayor sensibilidad podría ser de ayuda en este punto. En este caso, se pone de manifiesto que, aunque la metodología resulta adecuada para el estudio de proteínas platinadas, en el caso de muestras reales sería necesario llevar a cabo algún tipo de proceso de enriquecimiento de las especies con platino con objeto de maximizar las posibilidades de su detección final. Esto pasa, por ejemplo, por realizar prefraccionamientos de la muestra que permitan seleccionar fracciones abundantes en platino para su posterior estudio. Por otro lado, es deseable aumentar la resolución de los procesos de separación sin que eso suponga una merma en la recuperación de especies con platino. Por tanto, sería conveniente buscar agentes reductores para incluirlos durante las separaciones electroforéticas, que permitiesen mantener la integridad de los aductos Pt-proteínas. En esta línea, actualmente se está evaluando el empleo de diversas fosfinas como agentes reductores en sustitución de agentes sulfurados. Además, la utilización de agentes reductores durante la digestión o la aplicación del proceso sobre proteínas en estado reducido incrementa el rendimiento de la digestión y, por tanto, las posibilidades de detección de péptidos con platino. Otra alternativa deseable sería la capacidad de aislar selectivamente las especies platinadas, basándose en reacciones específicas asociadas a la presencia de platino.

En cualquier caso, en este trabajo se ha demostrado que la combinación de técnicas de espectrometría de masas elemental y molecular resulta altamente beneficiosa para el estudio de proteínas que se coordinan al platino. Su empleo será la base de este tipo de estudios metalómicos, constituyendo los pilares, en un futuro, de una metodología mejorada que resuelva los problemas encontrados en este trabajo.

Metodologías analíticas para el análisis de bioimágenes elementales: aplicación a estudios de nefrotoxicidad

El conocimiento de la distribución del Pt en las diferentes zonas del riñón puede ser una herramienta de gran ayuda para el estudio de los mecanismos de nefrotoxicidad y en la evaluación de posibles estrategias nefroprotectoras. Por lo tanto, uno de los objetivos de esta tesis fue el desarrollo de una metodología para la obtención de imágenes elementales directamente de tejidos de animales tras el tratamiento con cisplatino, recogido en el **trabajo 9**. En concreto, se abordó el análisis de láminas de riñón de rata Wistar a las que se les administró dosis farmacológicas de cisplatino (5 mg kg^{-1}) o ligeramente superiores (16 mg kg^{-1}) y que fueron sacrificadas pasados 5 ó 3 días, respectivamente, de la administración con el objetivo de

estudiar la distribución y acumulación de Pt en las diferentes secciones del riñón, así como su influencia en la distribución de otros metales esenciales como Cu y Zn. En dichas condiciones, las ratas presentaban signos externos (deterioro del aspecto físico, baja movilidad), y signos bioquímicos y fisiológicos indicadores de daño renal. La metodología desarrollada se basó en el empleo del acoplamiento LA-ICP-MS y ha permitido la obtención de imágenes elementales de gran calidad con una muy buena resolución (de hasta 8 μm), una gran sensibilidad (límites de detección de 50 fg) y reproducibilidad.

Estos excelentes resultados son consecuencia de varios aspectos clave del método de análisis como son: 1) El manejo de láminas de tejido de un espesor reducido (3 μm), sobre las que al realizar el escaneado completo del riñón, línea a línea, se consigue una ablación total del material, evitando de esta forma problemas de fraccionamiento; 2) Un óptimo transporte al plasma del material ablacionado, para lo cual resulta clave el empleo de He como gas transportador; 3) Señales de fondo de Pt muy bajas, tanto en el cristal que soporta la muestra como en el tejido control; 4) La utilización de un instrumento de SF, que al ser operado en el modo de baja resolución de masas ofrece una extraordinaria sensibilidad. La excelente resolución obtenida, principalmente debido a la elevada acumulación de Pt en el riñón y a la gran sensibilidad del método, permitió obtener imágenes elementales de las diferentes regiones del tejido. Incluso, trabajando con una buena resolución (8 μm), se obtuvo la distribución del platino entre subestructuras renales como los glomérulos o los túbulos, apreciándose su acumulación en las células tubulares de la corteza, y estando ausente en la luz tubular y en los glomérulos. No obstante, se comprobó que el empleo de una resolución de 100 μm permite obtener imágenes de una lámina completa de riñón con una calidad que resulta suficiente para distinguir de forma clara la distribución de los metales monitorizados en las diferentes estructuras renales, y en un tiempo de análisis suficientemente reducido (3h), lo que evita problemas asociados a las derivas instrumentales.

Dado que un método habitual de preparación de tejidos para técnicas de bioimagen es su fijación e introducción en bloques de parafina, se comprobó el efecto de la parafina en las láminas analizadas por LA-ICP-MS. Se concluyó la conveniencia del desparafinado previo, ya que la resolución de las imágenes resultaba ligeramente superior y la presencia de parafina puede suponer una contaminación innecesaria de la fuente de iones del espectrómetro de masas. Además, el proceso de desparafinado no supone una variación en la intensidad y distribución de los metales asociados a biomoléculas en el tejido.

Para la obtención de las imágenes se emplearon portamuestras de tipo SuperFrost Plus como soporte, que incluyen un recubrimiento polimérico que permite una mejor adhesión de la

sección de tejido. Esto permitió la generación de imágenes con gran calidad, al propiciar la ablación limpia de cada línea escaneada. Sin embargo, para producir la necesaria ablación completa del tejido en cada línea se produce inevitablemente cierta ablación del soporte, lo cual hizo imposible la aplicación de ^{13}C como estándar interno.

Ante el reto de la cuantificación elemental durante la obtención de bioimágenes con LA-ICP-MS, se planteó un método sencillo y rápido para la estimación de los niveles de platino en las láminas de riñón analizadas basado en la ablación de un tejido control tras la deposición de cantidades de Pt conocidas. Así, se estimó el contenido medio de Pt en los riñones de las ratas tratadas con el fármaco, que fue de $14 \mu\text{g Pt g}^{-1}$ tejido renal en el caso de ratas tratadas con 5 mg kg^{-1} cisplatino. Este resultado concuerda con los que se obtuvieron en estudios previos en el grupo de investigación para la determinación de Pt total mediante ICP-MS en muestras mineralizadas de tejido renal procedentes del mismo tipo de tratamientos, lo que confirma la fiabilidad de los resultados proporcionados por el método desarrollado.

La metodología de bioimágenes desarrollada permitió confirmar visualmente que la corteza renal y la zona de la unión corticomedular y columnas renales (todas ellas, regiones donde se produce el daño renal, a la luz de las alteraciones estructurales observadas durante su estudio histopatológico) experimentan un mayor nivel de acumulación de Pt, en comparación con otras regiones del riñón como la médula, donde las señales del metal resultaron ser un orden de magnitud inferiores. Estos resultados confirman los análisis realizados en los **trabajos 7 y 8** sobre extractos citosólicos de corteza y médula renales de ratas tratadas con cisplatino, donde se observó que la acumulación renal de cisplatino es globalmente superior en la corteza con respecto a la médula. Sin embargo, en el **trabajo 9** se ha conseguido visualizar detalladamente las zonas específicas de acumulación permitiendo detectar la mayor abundancia de Pt en las regiones donde se encuentran los segmentos S3 de los túbulo proximales renales, que presentan las células más sensibles al daño por cisplatino, tanto necrótico como apoptótico³⁵², de manera que se confirma la relación existente entre su acumulación y su efecto tóxico. Además, se ha encontrado una relación directa entre la acumulación de Pt, el daño renal asociado y la abundancia de transportadores de cisplatino en los diferentes tipos celulares del riñón. De hecho, son las células epiteliales de túbulo proximal las que presentan un mayor nivel de transportadores, incluyendo OCT2, CTR1 y el mecanismo de pinocitosis mediante balsas de colesterol. Esta mayor acumulación de Pt en el segmento S3 respecto a otras partes como el segmento S1 o el túbulo distal se observó anteriormente durante ensayos con células aisladas de estos tipos celulares,^{161, 353}.

El carácter multielemental del ICP-MS permitió monitorizar Cu y Zn simultáneamente al Pt, lo que hizo posible comprobar que tras el tratamiento con cisplatino se produce una reducción de los niveles renales de estos metales, en comparación con el análisis en paralelo de muestras de riñón de ratas control. En el caso del Cu, esta disminución se debe a la competencia que tiene lugar entre el cisplatino y este metal por el empleo del transportador CTR1 para entrar en las células tubulares. En el caso del Zn, al no presentar transportadores comunes al cisplatino, la disminución de su contenido, que tiene lugar en las regiones de acumulación de Pt, puede explicarse como un desplazamiento del Zn por el Pt en las proteínas, como en el caso de las MTs.¹²⁸ Estos efectos son especialmente apreciables en el caso de los riñones de ratas tratadas con 16 mg kg^{-1} donde la acumulación de Pt es un orden de magnitud superior respecto a las que recibieron una dosis de 5 mg kg^{-1} . La reducción en los niveles de metales esenciales como Cu y Zn en el riñón, observable en las regiones de acumulación del platino, provocando su desplazamiento de éstas, confirma lo que se apuntó en estudios anteriores sobre fracciones citosólicas de riñón.³⁵⁴

La gran sensibilidad y calidad de las imágenes elementales generadas muestra el potencial de la metodología desarrollada para el estudio de distribuciones de metales en otros tejidos de animales impactados por cisplatino, otros fármacos de platino y en general para el análisis de otros metales endógenos o exógenos, lo que puede tener interés en otros estudios biomédicos. Además, se ha demostrado que la producción de bioimágenes elementales permite la selección de regiones de interés en los tejidos examinados para efectuar ulteriores análisis metalómicos, en este caso, las células RPTECs que acumulan Pt y son dañadas durante el tratamiento con cisplatino, y que fueron estudiadas en el **trabajo 6**.

Desarrollo de estrategias nefroprotectoras en terapias con cisplatino

Dado el enorme problema que supone la nefrotoxicidad en las terapias con cisplatino, es de gran importancia buscar agentes protectores que permitan minimizar los efectos tóxicos del fármaco de forma selectiva sobre el órgano dañado (en este caso, el riñón), sin afectar a la actividad del fármaco sobre sus auténticas dianas (las células tumorales). La cilastatina se perfila como un buen candidato a ejercer esa función, dada la especificidad de su acción, ya que se une a la DHP-I, que es un ligando específico del riñón asociado a las balsas de colesterol presentes en la membrana de borde en cepillo de las RPTECs. En este caso, el empleo de métodos analíticos para la determinación elemental de Pt ha sido de importancia en la evaluación del efecto nefroprotector de cilastatina en terapias con cisplatino.

Se ha estudiado el efecto de cilastatina en modelos *in vitro* celulares de RPTECs (**trabajo 7**) e *in vivo* en ratas Wistar (**trabajo 8**), tratados con cisplatino. Se comprobó que su utilización produce una clara protección frente al daño renal inducido por el cisplatino y se constató que se localiza principalmente en las células epiteliales del túbulo proximal, predominando de forma general en la corteza renal y no así en la médula. Cilastatina protege de la muerte celular por apoptosis y del estrés oxidativo en las células tubulares renales y, por tanto, mejora la viabilidad celular e incluso la recuperación post-tratamiento. Además, se comprobó en estudios *in vitro* con distintas líneas celulares tumorales (**trabajos 7 y 8**) que cilastatina no ejercía influencia alguna en los efectos citotóxicos y apoptóticos del fármaco sobre estas células, conservando así su poder antitumoral. Estas observaciones reforzaron la teoría de que la acción de cilastatina se debe a la unión a DHP-I, que presenta bajos niveles de actividad en tipos celulares diferentes a RPTECs y, por tanto, la protección parece exclusiva de células con actividad en DHP-I. Esta unión inhibe la internalización de las balsas de colesterol de la membrana de borde en cepillo de las RPTECs, lo que podría suponer un bloqueo en uno de los mecanismos de entrada de cisplatino a la célula. Adicionalmente, este bloqueo también afecta a la internalización de los receptores de muerte celular como Fas-L unido a Fas, lo cual afecta a la vía extrínseca de la apoptosis en RPTECs, tal y como se observó.

El análisis de Pt total por ICP-MS proporcionó los niveles de fármaco presente en diversas muestras biológicas asociadas a estos estudios, con objeto de comparar los efectos del tratamiento con cilastatina en la entrada celular y llegada al ADN, así como su influencia en la farmacocinética del cisplatino, a la luz de la evolución temporal de los niveles de Pt en suero sanguíneo. Este tipo de muestras biológicas (extractos proteicos celulares, extractos de ADN, suero sanguíneo), presentan una matriz compleja que puede suponer un problema a la hora de la determinación elemental de platino. En este caso, no obstante, no fue necesario acudir a su mineralización para eliminar la matriz orgánica, ya que dado que los niveles de platino presentes en las muestras son fácilmente detectables empleando una técnica con tan bajos límites de detección como ICP-MS, el método admite cierta dilución de la muestra para reducir ese efecto matriz, que pudo ser corregido empleando ¹⁹¹Ir como patrón interno. La efectividad de esta corrección se comprobó y confirmó realizando calibrados paralelos de adiciones estándar para determinadas muestras. Además, el empleo de LA-ICP-MS para la obtención de bioimágenes directamente sobre las secciones de tejido completó el estudio de los efectos de cilastatina sobre los niveles elementales (**trabajo 9**) en riñón.

En el modelo celular de RPTECs (**trabajo 7**) se comprobó que el tratamiento con cilastatina provocaba una reducción significativa (24%) en los niveles de Pt acumulados en el

interior celular, así como en los niveles de Pt asociado a la fracción de ADN (55 y 44 % en células adherentes y no adherentes, respectivamente), durante el tratamiento con cisplatino. Esta disminución en los niveles de cisplatino intracelulares (considerando, como se introdujo en la sección 1.4.1 de la Introducción, que el cisplatino se metaboliza en las células renales a una especie nefrotóxica), junto al bloqueo de la vía extrínseca apoptótica, puede explicar la protección observada en este tipo celular, y en este caso, la reducción en los niveles de ADN platinado presentaría un papel secundario, al producirse la división de este tipo de células de forma lenta. Durante estos estudios también se observó que la tasa de entrada de cisplatino a las células es claramente dosis-dependiente, así como su efecto tóxico. Por otro lado, al estudiar el modelo animal, se constató que la acumulación de platino durante el tratamiento con cisplatino es considerablemente superior (2.8 veces) en los extractos citosólicos celulares de tejido cortical respecto al tejido medular (**trabajo 8**), lo que se confirmó en el **trabajo 9**, lo cual parece estar en clara conexión con el efecto tóxico localizado sobre las células RPTECs de la corteza. Además, en este caso, la co-administración de cilastatina mostraba una reducción de un 22% en los niveles de platino acumulados en los extractos celulares de corteza, mientras que no ejercía efecto significativo en dichos niveles en la médula (**trabajo 8**). Estos resultados fueron constatados en el **trabajo 9**, demostrando que la administración de cilastatina durante el tratamiento con cisplatino provoca una reducción notable en los niveles de Pt acumulados en la corteza renal, a juzgar por las imágenes elementales obtenidas en ciertas áreas seleccionadas de riñones de ratas tratadas, con una resolución de 18 μm .

Además, al comparar los cromatogramas SEC-ICP-MS para los extractos citosólicos, tanto de RPTECs del modelo celular como de corteza renal del modelo animal (**trabajos 7 y 8**), se observaron perfiles proteicos similares de platino tanto para los tratamientos sólo con cisplatino como para los que incluían la co-administración con cilastatina. Asimismo, se observó que todo el cisplatino se encontraba unido a biomoléculas, no encontrándose cisplatino libre o su monoacuocomplejo, lo que denota su rápida reactividad una vez que entra al interior celular. Todos estos resultados sirvieron para postular que durante el tratamiento con cilastatina se puede producir un bloqueo parcial en la entrada de cisplatino al interior celular a través de alguna de sus vías de transporte, sin que aparentemente tenga un efecto en las especies generadas dentro de las células. Este hecho, unido a que las células de la médula presentan una menor exposición a cisplatino que las de corteza debido a un menor nivel de transportadores en sus membranas, también podría explicar que no se observe una reducción significativa en los contenidos intracelulares de Pt en el caso de la médula renal.

Por otro lado, durante los análisis efectuados mediante SEC-ICP-MS sobre los extractos citosólicos de cortezas renales de ratas tratadas con los fármacos (**trabajo 8**), se monitorizaron también Cu y Zn, como se recoge en la Figura 26. Como puede observarse, la coadministración de cilastatina y cisplatino provocaba una ligera disminución en la intensidad de las señales de dichos elementos con respecto a la obtenida durante el tratamiento con cisplatino. Esta reducción también se confirmó a nivel cortical (**trabajo 9**) en las bioimágenes de Cu y Zn en secciones de riñón de ratas bajo ambos tipos de tratamientos (Figura 27). De esta forma, se postula que cilastatina pudiera también producir una leve reducción en los niveles de estos metales, posiblemente por una interacción con sus sistemas de transporte. La disminución simultánea de Cu y Pt podría relacionarse con una posible inhibición del transportador CTR1. En la médula, sin embargo, no se logró apreciar una reducción significativa en estos elementos. Este efecto también se confirmó en las muestras control tratadas y sin tratar con cilastatina. Sin embargo, es preciso estudiar con más detalle este efecto y sus implicaciones biológicas.

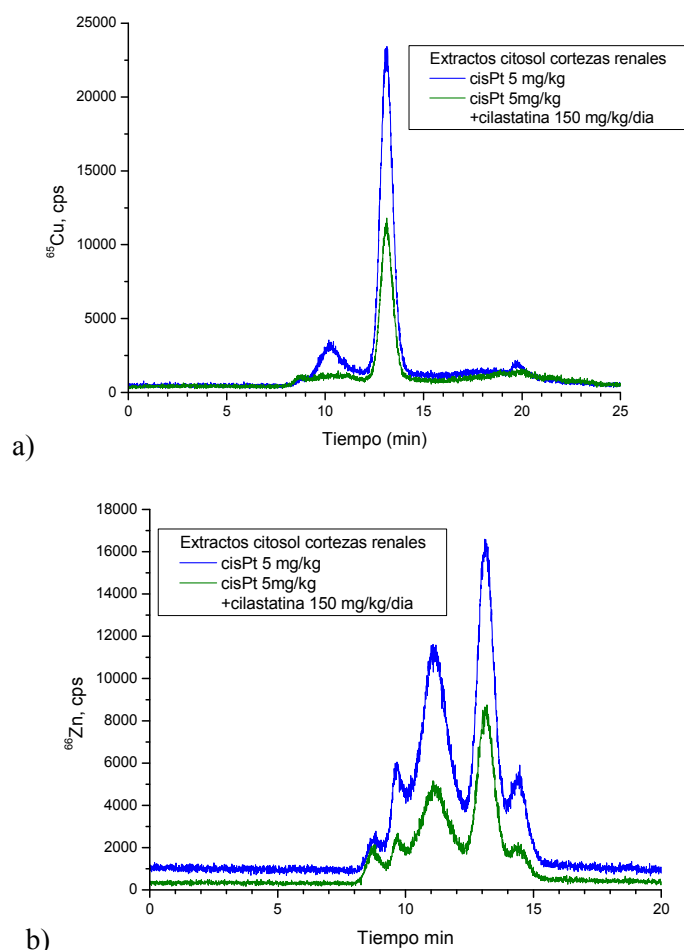


Figura 26. Cromatogramas SEC-ICP-MS para extractos citosólicos de corteza renal obtenida al 5 día del tratamiento de ratas wistar con cisplatino 5 mg/kg con o sin cilastatina 150 mg/kg, monitorizando a) ^{65}Cu y b) ^{66}Zn .

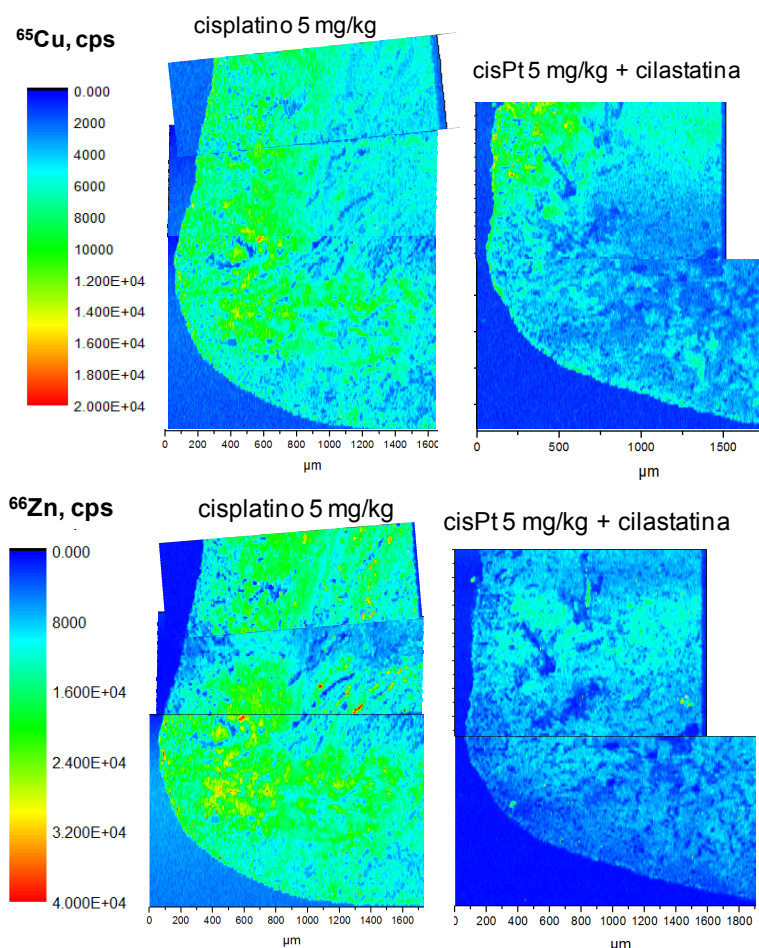


Figura 27. Imágenes LA-ICP-MS para regiones corticales de secciones de riñón de ratas tratadas con cisplatino 5 mg/kg +/- cilastatina 150 mg/kg día, obtenidas al día 5 de tratamiento, monitorizando a) ^{65}Cu , b) ^{66}Zn .

En el caso de células tumorales HeLa, aunque se producía una ligera disminución (de un 23 %) del Pt encontrado en la fracción citosólica proteica cuando a las células tratadas con cisplatino 30 μM se les adicionaba cilastatina respecto al tratamiento exclusivo con el fármaco, no se encontró variación significativa en los niveles de Pt asociado al ADN bajo ambos tratamientos, ni en el efecto antitumoral del fármaco (**trabajos 7 y 8**). Es destacable que las células HeLa resultaron ser mucho más sensibles que las RPTECs al tratamiento con cisplatino (con tasas de viabilidad celular tras 24 h del 30% y 71%, respectivamente) y que en la línea tumoral se hallaron niveles de Pt intracelulares 9.5 veces superiores que en las células renales. Dado que las células tumorales se replican muy rápidamente y que la acción antitumoral de cisplatino tiene lugar durante los procesos de división, y que los mecanismos de reparación de éstas suelen ser mucho menos efectivos que los de las sanas, es posible que al alcanzar cierto nivel de aductos con platino se desencadene en éstas la muerte celular, sin que en este caso se

observase una relación lineal entre el Pt intracelular y el Pt encontrado unido a ADN. Además es posible que en presencia de tan altos niveles de Pt intracelular en las células HeLa, exista cierta saturación de puntos a los que coordinarse el Pt al ADN, que explique el efecto anterior.

Por otro lado, la considerable disminución del Pt unido al ADN, que sí se observó al introducir cilastatina en las RPTECs, además de responder a la reducción en la entrada de cisplatino, puede deberse también a la protección inducida por cilastatina. Esta protección supone, como se ha expuesto, que se evite el desencadenamiento de la apoptosis por la vía extrínseca y por tanto, la célula presenta mayores opciones de reparar el ADN platinado y de eliminar los aductos formados, con mecanismos de por sí más efectivos que en las HeLa.

Todos estos resultados suponen que cilastatina induce una muy leve reducción en los niveles intracelulares acumulados de Pt que no depende de la presencia y actividad de DHP-I, sino de ciertos sistemas de transporte celulares afectados, pero que no tiene influencia significativa en la actividad antitumoral del fármaco (ni siquiera en líneas tumorales menos sensibles que HeLa). En cambio, esa ligera reducción sí resulta en la protección selectiva de células tubulares renales, donde la acción nefrotóxica parece ligada a la existencia de DHP-I, por lo que se trataría de dos efectos diferentes asociados al empleo de cilastatina.

La determinación de Pt total en fracciones de suero sanguíneo de ratas tratadas con el fármaco cisplatino o con su combinación con cilastatina, obtenidas a lo largo del tiempo, permitió estudiar y comparar la farmacocinética del cisplatino para los dos tipos de tratamientos (**trabajo 8**). En los dos casos se obtuvieron resultados parecidos a la vista de las similares áreas bajo la curva (AUC) calculadas. No obstante, se observó que el uso de cilastatina ofrecía una tasa de eliminación de cisplatino inferior, una $C_{m\acute{a}x}$ (concentración máxima del fármaco en suero) ligeramente menor y un tiempo de vida media del fármaco mayor. Sin embargo, al producirse una mejora en el aclaramiento de creatinina en orina tras el empleo de cilastatina, los ligeros cambios en la excreción de cisplatino pueden indicar ciertas diferencias en la reabsorción y secreción tubulares del fármaco.

A la vista de los resultados obtenidos, cilastatina se perfila como un candidato interesante para su empleo como nefroprotector durante terapias con cisplatino que actúa selectivamente sobre las células objeto de protección sin afectar a la actividad antitumoral del fármaco, requisito fundamental en este tipo de terapias. Por tanto, sería de interés abordar el estudio de su efectividad en ensayos clínicos en humanos, lo cual podría suponer su implementación en terapias antitumorales en un futuro próximo, permitiendo así la administración de dosis superiores de cisplatino, y por tanto, incrementando su efectividad antitumoral.

V. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo recogido en esta memoria se resumen a continuación:

- Se ha demostrado la utilidad de la aproximación “*top-down*” basada en MS para la caracterización de complejos Pt-proteínas, permitiendo la determinación de sitios específicos de unión en la secuencia proteica con un mínimo riesgo de alteración del enlace original. Su uso efectivo se limita a proteínas pequeñas aisladas y a aquéllas sin un número considerable de puentes disulfuro.

- La aproximación “*bottom-up*” permite un estudio más exhaustivo y efectivo de los complejos Pt-proteínas en cuanto a la localización de puntos de unión. Los procesos y reactivos implicados en la digestión en disolución convencional son compatibles con la conservación de los enlaces Pt-proteínas. La aplicación de una sonda de ultrasonidos puede ser una alternativa para la aceleración del proceso de digestión.

- El empleo de ESI para la ionización de proteínas/péptidos platinados durante su análisis por MS es más adecuado que MALDI para la conservación de la identidad de los aductos. Además, la fragmentación de péptidos platinados mediante CID resulta más informativa para la localización de puntos de unión del metal en la secuencia proteica que la producida por ETD.

- La 2-DE (combinación de SDS-PAGE e IEF) es una técnica apropiada para la separación de complejos Pt-proteínas, ofreciendo una buena resolución. El empleo de condiciones desnaturalizantes utilizando urea o SDS es compatible con la conservación de los complejos. La introducción de reactivos sulfurados como tiourea o los reductores DTT o BME, aunque puede mejorar la solubilidad y separación de las proteínas, puede producir la ruptura de los complejos, por lo que su uso no es aconsejable, especialmente cuando se empleen a altas concentraciones, durante tiempos prolongados, o que impliquen tratamientos térmicos. La utilización de azul de coomassie o de plata para la tinción de proteínas en el gel no afecta significativamente a los complejos Pt-proteínas.

- Se han desarrollado metodologías para la detección de las proteínas con platino después de su separación en gel, tanto basadas en la mineralización de bandas de SDS-PAGE y su determinación por ICP-MS, como mediante el análisis directo por LA-ICP-(SF)MS, proporcionando mejores resultados éste último. El secado de los geles previo a la ablación láser ofrece mejores resultados que la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. El mapeo total de un gel mediante LA-ICP-MS permite producir imágenes elementales completas,

pudiéndose encontrar las proteínas con platino sin necesidad de teñir el gel para localizar los “spots” proteicos.

- Se comprobó que el proceso convencional de digestión en gel de los spots proteicos para la identificación de proteínas con platino separadas mediante electroforesis en gel permite mantener los enlaces Pt-proteínas, produciendo péptidos con platino detectables mediante nLC-ESI-LTQ-MS/MS para las proteínas patrón empleadas (TF, HSA, CA, MYO, CYT C), y permitiendo encontrar puntos de unión específicos en las mismas. El uso de DTT como reductor produce una pérdida del Pt ligado a las proteínas y por tanto, efectos negativos en la detección.

- Se ha demostrado el gran potencial de la combinación de la espectrometría de masas elemental y molecular para realizar estudios de metaloproteómica de Pt. La metodología completa basada en separaciones con SDS-PAGE o 2-DE y el uso de LA-ICP-(SF)MS y nLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS permitió el análisis de proteínas con platino en muestras biológicas como suero de rata tratada con cisplatino o en extractos proteicos citosólicos de células RPTECs incubadas con el fármaco.

- Se ha desarrollado una metodología para la obtención de bioimágenes elementales sobre láminas de tejido renal de ratas tratadas con cisplatino, mediante el uso de LA-ICP-(SF) MS. Las imágenes obtenidas presentan gran sensibilidad y una excelente resolución (de hasta 8 μm), lo que convierten a esta técnica en un auténtico detector elemental a nivel microscópico e incluso a nivel celular. Estas capacidades han hecho posible distinguir la distribución de Pt, Cu y Zn en las diferentes subestructuras renales. Se ha observado una mayor acumulación de Pt en las zonas donde se sitúan los segmentos S3 del túbulo proximal, lo cual demuestra la relación existente entre la acumulación de platino y el daño estructural causado sobre este segmento. Además, se ha demostrado que la entrada de cisplatino a las células renales provoca una reducción en los niveles de Cu y Zn, y se postula que está asociada a una competencia en los mecanismos de transporte o a un desplazamiento a nivel proteico, respectivamente.

- Estudios realizados con modelos celulares y animales muestran a la cilastatina como un promotor nefroprotector aplicable durante terapias con cisplatino. A diferencia de otros compuestos, esta protección resultó ser exclusiva de las células renales RPTECs provistas de DHP-I, afectando a la vía extrínseca apoptótica, sin tener ningún efecto sobre la acción citostática de cisplatino en diversos tipos celulares tumorales. No obstante, la determinación con alta sensibilidad mediante ICP-MS del contenido de Pt total en extractos proteicos y en ADN; los estudios realizados mediante SEC-ICP-MS en extractos citosólicos renales; y el análisis directo sobre láminas de riñón de rata mediante LA-ICP-MS; han puesto de manifiesto que el uso de cilastatina produce una leve reducción en la acumulación de Pt tanto en las células de la corteza

renal como en las antitumorales HeLa. Cierta efecto de reducción se observó también para Cu y Zn en la corteza renal, por lo que posiblemente cilastatina provoque cierto grado de bloqueo de determinadas vías de entrada celular, como CTR1 o la internalización de balsas de colesterol en RPTECs con DHP-I. Los estudios farmacocinéticos revelaron un AUC similar para el tratamiento con cisplatino con o sin el protector.

CONCLUSIONS

The most relevant conclusions drawn along this work are summarized below:

- The MS-based “top-down” approach has turned out to be a suitable means for the characterization of Pt-protein complexes, revealing the location of Pt binding sites along the sequence with a minimum risk of alteration of the original metallic bonds. However, its use is limited to relatively small isolated proteins and to those without a considerable amount of disulfide bonds.

- The bottom-up approach allows a more effective and comprehensive study of Pt-protein complexes regarding the identification of Pt-binding sites. The reagents and processes involved in the conventional in-solution protein digestion are compatible with the preservation of Pt-protein bonds. The use of an ultrasonic probe can be considered an alternative for the acceleration of the digestion process.

- ESI is more appropriate than MALDI for the ionization of Pt-proteins/peptides during their MS analysis as it offers a better a higher degree of preservation of the adducts. Furthermore, the activation of platinated peptides by CID results in a more informative fragmentation for the localization of Pt-binding sites in the protein sequence as compared to ETD.

- 2-DE (combination of SDS-PAGE with IEF) is an appropriate separation technique with a good resolving power for Pt-protein complexes. The use of denaturing conditions with urea or SDS is compatible with the preservation of the complexes. Although sulfur-containing reagents such as thiourea or the reducers DTT and BME can improve proteins solubility and separation, their employment may lead to a disruption of the adducts. Therefore, their use is disrecommended, especially when long-term or termal treatments are applied. Protein staining with either Coomassie blue or silver does not significantly affect the Pt-protein complexes.

- Analytical methodologies were developed for the detection of Pt-proteins after their gel electrophoresis separation, either based on SDS-PAGE bands mineralization and Pt determination by ICP-MS or by direct analysis by LA-ICP-(SF)MS, the latter producing better

results. Gel-drying prior to laser ablation resulted in better results than electroblotting to nitrocellulose membranes. Total mapping of a gel by LA-ICP-MS allows producing complete elemental images, making possible to detect Pt protein spots with no need to stain the gel.

- The conventional in-gel digestion of protein spots for the identification of Pt-proteins separated by gel electrophoresis preserves the metal bonds and generates Pt-peptides that could be detected by nLC-ESI-LTQ-MS/MS for several standard proteins (TF, HSA, CA, MYO, CYT C). Consequently, specific Pt binding sites could be found in the proteins. The use of DTT as a reducing agent caused a negative impact on their detection.

- The potential of the combination of atomic and molecular mass spectrometry for Pt metalloproteomics studies has been demonstrated. The complete methodology based in SDS-PAGE or 2-DE separations and the use of LA-ICP-MS and nLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS allowed the analysis of Pt proteins in biological samples such as serum from a rat treated with cisplatin or cytosolic extracts from RPTECs incubated with the drug.

- A methodology for elemental bioimaging by using LA-ICP-(SF) MS on kidney slices from rats treated with cisplatin was developed. The high sensitivity and resolution (up to 8 μm) of the images produced, show the capabilities of this technique, which could be exploited as an elemental microscopic detector even at cellular level. Indeed, these features made possible to discern Pt, Cu and Zn distribution among the different renal substructures. A higher Pt accumulation was observed in the areas where the S3 segments of the proximal tubules are placed, which demonstrates the connection between metal accumulation and structural damage caused in such part. Moreover, it has been disclosed that the influx of cisplatin to the cells results in a decrease in the Cu and Zn levels, which has been attributed to a competition for the transporters or a displacement at the protein level, respectively.

- Studies carried out in both cell and rat models revealed that cilastatin can be considered a promising nephroprotector during cisplatin-based therapies. Unlike other compounds, this protection turned out to be exclusive for DHP-I-bearing RPTECs, affecting the extrinsic apoptotic pathway, with no effect on cisplatin cytotoxic activity on several tumoral cell types. However, the high sensitivity determination of total Pt by ICP-MS in protein extracts, DNA, in addition to SEC-ICP-MS studies on renal cytosolic extracts and direct analysis by LA-ICP-MS on rat kidney slices, showed that the use of cilastatin leads to a reduced cisplatin accumulation in both the renal cortex and HeLa cells. A similar effect was observed for Cu and Zn in the renal cortex, indicating the possible blocking to some extent of entrance pathways for the metals, such as CTR1 or the internalization of lipid rafts in DHP-I-bearing RPTECs. Pharmacokinetics studies showed a similar AUC for cisplatin therapies irrespective of the administration of cilastatin.

**VI. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS/
SUGGESTIONS FOR FUTURE RESEARCH**

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

- Desarrollar métodos de preconcentración en especies (proteínas o péptidos) de platino basados en prefraccionamientos y selección de fracciones ricas en platino, sobre las que aplicar posteriores separaciones, con objeto de mejorar las posibilidades de detección e identificación de las proteínas platinadas.
- Mejorar la resolución de las separaciones electroforéticas de complejos Pt-proteínas mediante 2-DE introduciendo el empleo de agentes reductores que permitan mantener los aductos originales. Una alternativa a los reductores sulfurados habituales podría ser el empleo de fosfinas. El empleo con éxito de dichos reductores alternativos para efectuar la digestión proteica también aumentaría las posibilidades de detección de puntos de coordinación del platino en proteínas mediante nLC-ESI-MS/MS.
- Aplicación de las metodologías desarrolladas para la obtención de bioimágenes elementales sobre otros órganos o tejidos que puedan acumular Pt durante las terapias con cisplatino, como cerebro o hígado. Estudio de la acumulación de metales y su efecto sobre otros elementos esenciales durante terapias con otros fármacos de platino u otros compuestos de base metálica. Producción de mapas elementales 3D para órganos completos.
- Estudio en profundidad de estrategias nefroprotectoras para tratamientos con cisplatino basadas en el empleo de cilastatina sobre modelos animales a los que se les induciría un tumor y posteriormente sobre humanos. Completar el estudio de su mecanismo de acción y revelar las causas e implicaciones de la reducción de los niveles elementales que conlleva su empleo. Combinar el empleo de cilastatina con otros posibles nefroprotectores basados en otros mecanismos como la utilización de cimetidina, un agente bloqueante de OCT2.
- Examinar los efectos inducidos por cisplatino sobre la expresión proteica en células y tejidos de riñón, para establecer su relación con los efectos nefrotóxicos, mediante métodos de proteómica cuantitativa.

SUGGESTIONS FOR FUTURE RESEARCH

- Development of preconcentration methodologies for Pt species (proteins or peptides) based on sample prefractionation followed by selection of Pt-rich fractions to be further separated, with the aim to increase the chances of detection and identification of Pt-protein complexes.
- Improvement of the resolution of 2-DE separations for Pt-protein complexes by using reducing agents that may allow the preservation of the original adducts. Some phosphines could be assayed as an alternative to the commonly used sulfur-containing reducers. The use of such reagents during protein digestions could also improve the detection of Pt-binding sites in proteins by nLC-ESI-MS/MS analysis.
- Application of the developed methodology for elemental bioimaging in organs or tissues different from kidney that may accumulate Pt during cisplatin-therapies, such as brain or liver. Study of metal accumulation and their effect on other essential metals during therapies with other Pt drugs or different metal-based drugs. 3D elemental imaging of complete organs could be carried out to get a more detailed and comprehensive distribution map of the metals.
- In-depth studies on nephroprotective strategies for cisplatin therapies could be performed in tumour-bearing animals and then, in humans, based on the use of cilastatin. It would be recommendable to deepen into its mechanism of action and to reveal the causes and consequences of the metal accumulation decrease implied during its use. Evaluation of the combined use of cilastatin with other nephroprotector with a different mechanism of action such as cimetidine, an OCT2-blocking agent, during cisplatin-therapies could also be advisable.
- Study of the cisplatin-induced dysregulation of proteins in kidney tissues and cells, so as to determine its connection with nephrotoxicity, by using quantitative proteomic approaches.

-

VII. BIBLIOGRAFÍA/ REFERENCES

VII. BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. Peyrone, M., Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1844**, 51, (1), 1-29.
2. Werner, A., Beitrag zur Konstitution anorganischer Verbindungen. *Zeitschrift für anorganische Chemie* **1893**, 3, (1), 267-330.
3. Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T., Inhibition of cell division in Escherichia Coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **1965**, 205, (4972), 698-699.
4. Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H., Platinum Compounds - a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, 222, (5191), 385-386.
5. Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R., The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions* **2010**, 39, (35), 8113-8127.
6. Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A., Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics* **2009**, 1, (6), 458-470.
7. Casini, A.; Hartinger, C.; Gabbiani, C.; Mini, E.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K.; Messori, L., Gold(III) compounds as anticancer agents: Relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102, (3), 564-575.
8. Timerbaev, A. R., Advances in developing tris(8-quinolinolato)gallium(III) as an anticancer drug: critical appraisal and prospects. *Metallomics* **2009**, 1, (3), 193-198.
9. Pelletier, F.; Comte, V.; Massard, A.; Wenzel, M.; Toulot, S.; Richard, P.; Picquet, M.; Le Gendre, P.; Zava, O.; Edafe, F.; Casini, A.; Dyson, P. J., Development of Bimetallic Titanocene-Ruthenium-Arene Complexes As Anticancer Agents: Relationships between Structural and Biological Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53, (19), 6923-6933.
10. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 35th ed.; Pharmaceutical Press: 2007.
11. Rabik, C. A.; Dolan, M. E., Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* **2007**, 33, (1), 9-23.
12. Dabrowiak, J. C., *Metals in Medicine*. John Wiley & Sons Ltd.: 2009.
13. Reece, P. A.; Stafford, I.; Abbott, R. L.; Anderson, C.; Denham, J.; Freeman, S.; Morris, R. G.; Gill, P. G.; Olweny, C. L., Two- versus 24-hour infusion of cisplatin: pharmacokinetic considerations. *Journal of Clinical Oncology* **1989**, 7, (2), 270-5.
14. Pfeiffer, P.; Asmussen, L.; Kvist-Poulsen, H.; Bertelsen, K., Intraperitoneal chemotherapy: Introduction of a new "single use" delivery system—A preliminary report. *Gynecologic Oncology* **1989**, 35, (1), 47-49.
15. Barefoot, R. R., Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anticancer drugs. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, 751, (2), 205-211.
16. Tothill, P.; Klys, H. S.; Matheson, L. M.; McKay, K.; Smyth, J. F., The Long-Term Retention of Platinum in Human Tissues Following the Administration of Cisplatin or Carboplatin for Cancer-Chemotherapy. *European Journal of Cancer* **1992**, 28A, (8-9), 1358-1361.
17. Bernersprice, S. J.; Frenkiel, T. A.; Frey, U.; Ranford, J. D.; Sadler, P. J., Hydrolysis Products of Cisplatin - Pka Determinations Via [H-1, N-15] Nmr-Spectroscopy. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1992**, (10), 789-791.
18. Kozelka, J., Molecular origin of the sequence-dependent kinetics of reactions between cisplatin derivatives and DNA. *Inorganica Chimica Acta* **2009**, 362, (3), 651-668.
19. Miller, S. E.; Gerard, K. J.; House, D. A., The Hydrolysis Products of Cis-Diamminedichloroplatinum(II). 6. A Kinetic Comparison of the Cis-Isomers and Transisomers and Other Cis-Di(Amine)Di(Chloro)Platinum(II) Compounds. *Inorganica Chimica Acta* **1991**, 190, (1), 135-144.

20. Bancroft, D. P.; Lepre, C. A.; Lippard, S. J., Pt-195 Nmr Kinetic and Mechanistic Studies of Cis-Diamminedichloroplatinum and Trans-Diamminedichloroplatinum(II) Binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112, (19), 6860-6871.
21. Casas, J. S.; Moreno, V.; Sánchez, A.; Sánchez, J. L.; Sordo, J., *Química Bioinorgánica*. Síntesis: Madrid, 2002.
22. Sze, C.; Khairallah, G.; Xiao, Z.; Donnelly, P.; O'Hair, R.; Wedd, A., Interaction of cisplatin and analogues with a Met-rich protein site. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2009**, 14, (2), 163-165.
23. Szpunar, J.; Makarov, A.; Pieper, T.; Keppler, B. K.; Lobinski, R., Investigation of metallodrug-protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Analytica Chimica Acta* **1999**, 387, (2), 135-144.
24. Timerbaev, A. R.; Hartinger, C. G.; Aleksenko, S. S.; Keppler, B. K., Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology. *Chemical Reviews* **2006**, 106, (6), 2224-2248.
25. Ivanov, A. I.; Christodoulou, J.; Parkinson, J. A.; Barnham, K. J.; Tucker, A.; Woodrow, J.; Sadler, P. J., Cisplatin binding sites on human albumin. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273, (24), 14721-14730.
26. Will, J.; Wolters, D. A.; Sheldrick, W. S., Characterisation of Cisplatin Binding Sites in Human Serum Proteins Using Hyphenated Multidimensional Liquid Chromatography and ESI Tandem Mass Spectrometry. *Chemmedchem* **2008**, 3, (11), 1696-1707.
27. Hu, W.; Luo, Q.; Wu, K.; Li, X.; Wang, F.; Chen, Y.; Ma, X.; Wang, J.; Liu, J.; Xiong, S.; Sadler, P. J., The anticancer drug cisplatin can cross-link the interdomain zinc site on human albumin. *Chemical Communications* **2011**, 47, (21), 6006-6008.
28. Khalaila, I.; Allardyce, C. S.; Verma, C. S.; Dyson, P. J., A mass spectrometric and molecular modelling study of cisplatin binding to transferrin. *ChemBioChem* **2005**, 6, (10), 1788-1795.
29. Esteban-Fernandez, D.; Montes-Bayon, M.; Gonzalez, E. B.; Gomez, M. M. G.; Palacios, M. A.; Sanz-Medel, A., Atomic (HPLC-ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cisplatin interactions with serum proteins. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2008**, 23, (3), 378-384.
30. Binks, S. P.; Dobrota, M., Kinetics and Mechanism of Uptake of Platinum-Based Pharmaceuticals by the Rat Small-Intestine. *Biochemical Pharmacology* **1990**, 40, (6), 1329-1336.
31. Mann, S. C.; Andrews, P. A.; Howell, S. B., Modulation of Cis-Diamminedichloroplatinum(II) Accumulation and Sensitivity by Forskolin and 3-Isobutyl-1-Methylxanthine in Sensitive and Resistant Human Ovarian-Carcinoma Cells. *International Journal of Cancer* **1991**, 48, (6), 866-872.
32. Hall, M. D.; Okabe, M.; Shen, D. W.; Liang, X. J.; Gottesman, M. M., The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2008**, 48, 495-535.
33. Dresser, M. J.; Leabman, M. K.; Giacomini, K. M., Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: Organic anion transporters and organic cation transporters. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, 90, (4), 397-421.
34. Muller, J.; Lips, K. S.; Metzner, L.; Neubert, R. H. H.; Koepsell, H.; Brandsch, M., Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochemical Pharmacology* **2005**, 70, (12), 1851-1860.
35. Ciarimboli, G., Organic Cation Transporters 2 as Mediators of Cisplatin Nephrotoxicity. *Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemotherapy* **2009**, 353-358.
36. Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I., Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, (22), 14298-14302.
37. Safaei, R.; Howell, S. B., Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Critical Reviews in Oncology Hematology* **2005**, 53, (1), 13-23.

38. Safaei, R., Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Letters* **2006**, 234, (1), 34-39.
39. Wang, X.; Du, X.; Li, H.; Chan, D. S.-B.; Sun, H., The Effect of the Extracellular Domain of Human Copper Transporter (hCTR1) on Cisplatin Activation. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50, (12), 2706-2711.
40. Cheng, P. W.; Liu, S. H.; Hsu, C. J.; Lin-Shiau, S. Y., Correlation of increased activities of Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase with the reversal of cisplatin ototoxicity induced by D-methionine in guinea pigs. *Hearing Research* **2005**, 205, (1-2), 102-109.
41. Liang, X. J.; Shen, D. W.; Chen, K. G.; Wincovitch, S. M.; Garfield, S. H.; Gottesman, M. M., Trafficking and localization of platinum complexes in cisplatin-resistant cell lines monitored by fluorescence-labeled platinum. *Journal of Cellular Physiology* **2005**, 202, (3), 635-641.
42. Komatsu, M.; Sumizawa, T.; Mutoh, M.; Chen, Z. S.; Terada, K.; Furukawa, T.; Yang, X. L.; Gao, H.; Miura, N.; Sugiyama, T.; Akiyama, S., Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Research* **2000**, 60, (5), 1312-1316.
43. Nakayama, K.; Kanzaki, A.; Terada, K.; Mutoh, M.; Ogawa, K.; Sugiyama, T.; Takenoshita, S.; Itoh, K.; Yaegashi, N.; Miyazaki, K.; Neamati, N.; Takebayashi, Y., Prognostic value of the Cu-transporting ATPase in ovarian carcinoma patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research* **2004**, 10, (8), 2804-2811.
44. Dmitriev, O. Y., Mechanism of tumor resistance to cisplatin mediated by the copper transporter ATP7B. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* **2011**, 89, (2), 138-147.
45. Safaei, R.; Otani, S.; Larson, B. J.; Rasmussen, M. L.; Howell, S. B., Transport of Cisplatin by the Copper Efflux Transporter ATP7B. *Molecular Pharmacology* **2008**, 73, (2), 461-468.
46. Samimi, G.; Katano, K.; Holzer, A. K.; Safaei, R.; Howell, S. B., Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Molecular Pharmacology* **2004**, 66, (1), 25-32.
47. Cui, Y.; Konig, J.; Buchholz, J. K.; Spring, H.; Leier, I.; Keppler, D., Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* **1999**, 55, (5), 929-37.
48. Wang, D.; Lippard, S. J., Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, 4, (4), 307-320.
49. Palm, M. E.; Weise, C. F.; Lundin, C.; Wingsle, G.; Nygren, Y.; Bjorn, E.; Naredi, P.; Wolf-Watz, M.; Wittung-Stafshede, P., Cisplatin binds human copper chaperone Atox1 and promotes unfolding in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, (17), 6951-6956.
50. Larson, C. A.; Adams, P. L.; Blair, B. G.; Safaei, R.; Howell, S. B., The Role of the Methionines and Histidines in the Transmembrane Domain of Mammalian Copper Transporter 1 in the Cellular Accumulation of Cisplatin. *Molecular Pharmacology* **2010**, 78, (3), 333-339.
51. Wu, Z.; Liu, Q.; Liang, X.; Yang, X.; Wang, N.; Wang, X.; Sun, H.; Lu, Y.; Guo, Z., Reactivity of platinum-based antitumor drugs towards a Met- and His-rich 20mer peptide corresponding to the N-terminal domain of human copper transporter 1. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2009**, 14, (8), 1313-1323.
52. Arnesano, F.; Scintilla, S.; Natile, G., Interaction between Platinum Complexes and a Methionine Motif Found in Copper Transport Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, (47), 9062-9064.
53. Larson, C. A.; Adams, P. L.; Jandial, D. D.; Blair, B. G.; Safaei, R.; Howell, S. B., The role of the N-terminus of mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of cisplatin. *Biochemical Pharmacology* **2010**, 80, (4), 448-454.
54. Lippard, S. J.; Jung, Y. W., Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chemical Reviews* **2007**, 107, (5), 1387-1407.

55. Miller, S. E.; House, D. A., The Hydrolysis Products of Cis-Dichlorodiammineplatinum(II) .3. Hydrolysis Kinetics at Physiological Ph. *Inorganica Chimica Acta* **1990**, 173, (1), 53-60.
56. Kasherman, Y.; Sturup, S.; Gibson, D., Is Glutathione the Major Cellular Target of Cisplatin? A Study of the Interactions of Cisplatin with Cancer Cell Extracts. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, (14), 4319-4328.
57. Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Abou-Shakra, F. R.; Birtwistle, H.; Coffey, J., Inductively coupled plasma mass spectrometry to identify protein drug targets from whole cell systems. *Chemical Communications* **2001**, (24), 2708-2709.
58. Rebillard, A.; Tekpli, X.; Meurette, O.; Sergent, O.; LeMoigne-Muller, G.; Vernhet, L.; Gorria, M.; Chevanne, M.; Christmann, M.; Kaina, B.; Counillon, L.; Gulbins, E.; Lagadic-Gossmann, D.; Dimanche-Boitrel, M. T., Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. *Cancer Research* **2007**, 67, (16), 7865-7874.
59. Speelmans, G.; Sips, W. H. H. M.; Grisel, R. J. H.; Staffhorst, R. W. H. M.; Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Reedijk, J.; deKruijff, B., The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1996**, 1283, (1), 60-66.
60. Wang, K.; Lu, J. F.; Li, R. C., The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordination Chemistry Reviews* **1996**, 151, 53-88.
61. Kruidering, M.; van de Water, B.; Zhan, Y.; Baelde, J. J.; de Heer, E.; Mulder, G. J.; Stevens, J. L.; Nagelkerke, J. F., Cisplatin effects on F-actin and matrix proteins precede renal tubular cell detachment and apoptosis in vitro. *Cell Death and Differentiation* **1998**, 5, (7), 601-614.
62. Zeng, H. H.; Xu, Z. H.; Wang, K., FT-Raman studies on the transformation of G-actin to F-actin, the binding of cisplatin and transplatin to F-actin and the effects of the conformation of F-actin. *International Journal of Biological Macromolecules* **1997**, 20, (2), 107-113.
63. Tulub, A. A.; Stefanov, V. E., Cisplatin stops tubulin assembly into microtubules. A new insight into the mechanism of antitumor activity of platinum complexes. *International Journal of Biological Macromolecules* **2001**, 28, (3), 191-198.
64. Centerwall, C. R.; Goodisman, J.; Kerwood, D. J.; Dabrowiak, J. C., Cisplatin Carbonato Complexes. Implications for Uptake, Antitumor Properties, and Toxicity. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (37), 12768-12769.
65. Hostetter, A. A.; Osborn, M. F.; DeRose, V. J., RNA-Pt Adducts Following Cisplatin Treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Chemical Biology* **2011**.
66. Custodio, J. B. A.; Cardoso, C. M. P.; Santos, M. S.; Almeida, L. M.; Vicente, J. A. F.; Fernandes, M. A. S., Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: Prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology* **2009**, 259, (1-2), 18-24.
67. Knipp, M.; Karotki, A. V.; Chesnov, S.; Natile, G.; Sadler, P. J.; Brabec, V.; Vasak, M., Reaction of Zn(II)Metallothionein with cis- and trans-[Pt(N-donor)(2)Cl-2] anticancer complexes: trans-Pt-II complexes retain their N-donor ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, (17), 4075-4086.
68. Gibson, D., The mechanism of action of platinum anticancer agents-what do we really know about it? *Dalton Transactions* **2009**, (48), 10681-10689.
69. Arner, E. S. J.; Nakamura, H.; Sasada, T.; Yodoi, J.; Holmgren, A.; Spyrou, G., Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, 31, (10), 1170-1178.
70. Hartinger, C. G.; Tsybin, Y. O.; Fuchser, J.; Dyson, P. J., Characterization of platinum anticancer drug protein-binding sites using a top-down mass spectrometric approach. *Inorganic Chemistry* **2008**, 47, (1), 17-19.

71. Hartinger, C. G.; Ang, W. H.; Casini, A.; Messori, L.; Keppler, B. K.; Dyson, P. J., Mass spectrometric analysis of ubiquitin-platinum interactions of leading anticancer drugs: MALDI versus ESI. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2007**, 22, (8), 960-967.
72. Peleg-Shulman, T.; Najajreh, Y.; Gibson, D., Interactions of cisplatin and transplatin with proteins. Comparison of binding kinetics, binding sites and reactivity of the Pt-protein adducts of cisplatin and transplatin towards biological nucleophiles. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, 91, (1), 306-311.
73. Zhao, T.; King, F., Mass-spectrometric characterization of cisplatin binding sites on native and denatured ubiquitin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, 16, (4), 633-639.
74. Cepeda, V.; Fuertes, M. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Quevedo, C.; Perez, J. M., Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2007**, 7, (1), 3-18.
75. Soti, C.; Racz, A.; Csermely, P., A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90 - N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, (9), 7066-7075.
76. Maurmann, L.; Bose, R. N., Unwinding of zinc finger domain of DNA polymerase I by cis-diamminedichloroplatinum(II). *Dalton Transactions* **2010**, 39, (34), 7968-7979.
77. de Paula, Q. A.; Mangrum, J. B.; Farrell, N. P., Zinc finger proteins as templates for metal ion exchange: Substitution effects on the C-finger of HIV nucleocapsid NCp7 using M(chelate) species (M = Pt, Pd, Au). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2009**, 103, (10), 1347-1354.
78. Bose, R. N.; Yang, W. W.; Evanics, F., Structural perturbation of a C4 zinc-finger module by cis-diamminedichloroplatinum(II): insights into the inhibition of transcription processes by the antitumor drug. *Inorganica Chimica Acta* **2005**, 358, (10), 2844-2854.
79. Calderone, V.; Casini, A.; Mangani, S.; Messori, L.; Orioli, P. L., Structural investigation of cisplatin-protein interactions: Selective platination of His19 in a cuprozinc superoxide dismutase. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (8), 1267-1269.
80. Casini, A.; Gabbiani, C.; Mastrobuoni, G.; Messori, L.; Moneti, G.; Pieraccini, G., Exploring metallodrug-protein interactions by ESI mass spectrometry: The reaction of anticancer platinum drugs with horse heart cytochrome c. *Chemmedchem* **2006**, 1, (4), 413-417.
81. Zhao, T.; King, F. L., Direct Determination of the Primary Binding Site of Cisplatin on Cytochrome c by Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20, (6), 1141-1147.
82. Zhao, T.; King, F. L., A mass spectrometric comparison of the interactions of cisplatin and transplatin with myoglobin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, 104, (2), 186-192.
83. Li, H.; Zhao, Y.; Phillips, H. I. A.; Qi, Y.; Lin, T.-Y.; Sadler, P. J.; O'Connor, P. B., Mass Spectrometry Evidence for Cisplatin As a Protein Cross-Linking Reagent. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, (13), 5369-5376.
84. Li, H.; Lin, T.-Y.; Van Orden, S. L.; Zhao, Y.; Barrow, M. P.; Pizarro, A. M.; Qi, Y.; Sadler, P. J.; O'Connor, P. B., Use of Top-Down and Bottom-Up Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Mapping Calmodulin Sites Modified by Platinum Anticancer Drugs. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, (24), 9507-9515.
85. Jarve, R. K.; Aggarwal, S. K., Cisplatin-induced inhibition of the calcium-calmodulin complex, neuronal nitric oxide synthase activation and their role in stomach distention. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1997**, 39, (4), 341-348.
86. Will, J.; Sheldrick, W. S.; Wolters, D., Characterisation of cisplatin coordination sites in cellular Escherichia coli DNA-binding proteins by combined biphasic liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, 13, (3), 421-434.
87. Stefanopoulou, M.; Kokoschka, M.; Sheldrick, W. S.; Wolters, D. A., Cell response of Escherichia coli to cisplatin-induced stress. *Proteomics* **2011**, 11, (21), 4174-4188.

88. Yu, F.; Megyesi, J.; Price, P. M., Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2008**, 295, (1), F44-F52.
89. Lippard, S. J.; Todd, R. C., Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* **2009**, 1, (4), 280-291.
90. Kelland, L., The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* **2007**, 7, (8), 573-584.
91. Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J., Crystal-Structure of Double-Stranded DNA Containing the Major Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin. *Nature* **1995**, 377, (6550), 649-652.
92. Lippard, S. J.; Todd, R. C., Structure of duplex DNA containing the cisplatin 1,2-{Pt(NH₃)(2)}(2+)-d(GpG) cross-link at 1.77 angstrom resolution. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, 104, (9), 902-908.
93. Teuben, J. M.; Bauer, C.; Wang, A. H. J.; Reedijk, J., Solution structure of a DNA duplex containing a cis-diammineplatinum(II) 1,3-d(GTG) intrastrand cross-link, a major adduct in cells treated with the anticancer drug carboplatin. *Biochemistry* **1999**, 38, (38), 12305-12312.
94. Vangarderen, C. J.; Vanhoute, L. P. A., The Solution Structure of a DNA Duplex Containing the Cis-Pt(NH₃)(2)[D(-Gtg-)-N7(G), N7(G)] Adduct, as Determined with High-Field Nmr and Molecular Mechanics/Dynamics. *European Journal of Biochemistry* **1994**, 225, (3), 1169-1179.
95. Coste, F.; Malinge, J. M.; Serre, L.; Shepard, W.; Roth, M.; Leng, M.; Zelwer, C., Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 angstrom resolution: hydration at the platinated site. *Nucleic Acids Research* **1999**, 27, (8), 1837-1846.
96. Huang, H. F.; Zhu, L. M.; Reid, B. R.; Drobny, G. P.; Hopkins, P. B., Solution Structure of a Cisplatin-Induced DNA Interstrand Cross-Link. *Science* **1995**, 270, (5243), 1842-1845.
97. Ober, M.; Lippard, S. J., A 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link influences the rotational and translational setting of DNA in nucleosomes. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, (9), 2851-2861.
98. Ober, M.; Lippard, S. J., Cisplatin damage overrides the predefined rotational setting of positioned nucleosomes. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, (19), 6278-6286.
99. Lippard, S. J.; Hoeschele, J. D., Binding of cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to the nucleosome core. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1979**, 76, (12), 6091-6095.
100. Perez, J. M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C., Current status of the development of trans-platinum antitumor drugs. *Critical Reviews in Oncology Hematology* **2000**, 35, (2), 109-120.
101. Kartalou, M.; Essigmann, J. M., Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2001**, 478, (1-2), 1-21.
102. Ugrinova, I.; Zlateva, S.; Pashev, I. G.; Pasheva, E. A., Native HMGB1 protein inhibits repair of cisplatin-damaged nucleosomes in vitro. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2009**, 41, (7), 1556-1562.
103. Sharma, A.; Ramanjaneyulu, A.; Ray, R.; Rajeswari, M. R., Involvement of High Mobility Group B Proteins in Cisplatin-Induced Cytotoxicity in Squamous Cell Carcinoma of Skin. *DNA and Cell Biology* **2009**, 28, (7), 311-318.
104. Jung, Y. W.; Lippard, S. J., Nature of full-length HMGB1 binding to cisplatin-modified DNA. *Biochemistry* **2003**, 42, (9), 2664-2671.
105. Ohndorf, U. M.; Rould, M. A.; He, Q.; Pabo, C. O.; Lippard, S. J., Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature* **1999**, 399, (6737), 708-712.
106. Park, S.; Lippard, S. J., Redox State-Dependent Interaction of HMGB1 and Cisplatin-Modified DNA. *Biochemistry* **2011**, 50, (13), 2567-2574.

107. Kartalou, M.; Samson, L. D.; Essigmann, J. M., Cisplatin adducts inhibit 1,N-6-etheno-adenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry* **2000**, 39, (27), 8032-8038.
108. Huang, J. C.; Zamble, D. B.; Reardon, J. T.; Lippard, S. J.; Sancar, A., Hmg-Domain Proteins Specifically Inhibit the Repair of the Major DNA Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin by Human Excision Nuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, (22), 10394-10398.
109. Scharer, O. D., Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, 42, (26), 2946-2974.
110. Kartalou, M.; Essigmann, J. M., Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2001**, 478, (1-2), 23-43.
111. Beljanski, V.; Marzilli, L. G.; Doetsch, P. W., DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. *Molecular Pharmacology* **2004**, 65, (6), 1496-1506.
112. Wang, J. Y.; Ho, T.; Trojanek, J.; Chintapalli, J.; Grabacka, M.; Stoklosa, T.; Garcia, F. U.; Skorski, T.; Reiss, K., Impaired homologous recombination DNA repair and enhanced sensitivity to DNA damage in prostate cancer cells exposed to anchorage-independence. *Oncogene* **2005**, 24, (23), 3748-3758.
113. Lin, X. J.; Trang, J.; Okuda, T.; Howell, S. B., DNA polymerase zeta accounts for the reduced cytotoxicity and enhanced mutagenicity of cisplatin in human colon carcinoma cells that have lost DNA mismatch repair. *Clinical Cancer Research* **2006**, 12, (2), 563-568.
114. Albertella, M. R.; Green, C. M.; Lehmann, A. R.; O'Connor, M. J., A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Research* **2005**, 65, (21), 9799-9806.
115. Tewari, K. S.; Mehta, R. S.; Burger, R. A.; Yu, I. R.; Kyshtoobayeva, A. S.; Monk, B. J.; Manetta, A.; Berman, M. L.; Disaia, P. J.; Fruehauf, J. P., Conservation of in vitro drug resistance patterns in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* **2005**, 98, (3), 360-8.
116. Giaccone, G., Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* **2000**, 59, 9-17.
117. Jacobs, C.; Lyman, G.; Velezgarci, E.; Sridhar, K. S.; Knight, W.; Hochster, H.; Goodnough, L. T.; Mortimer, J. E.; Einhorn, L. H.; Schacter, L.; Chong, N.; Dalton, T.; Burroughs, J.; Rozenweig, M., A Phase-III Randomized Study Comparing Cisplatin and Fluorouracil as Single Agents and in Combination for Advanced Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of Clinical Oncology* **1992**, 10, (2), 257-263.
118. Holzer, A. K.; Katano, K.; Klomp, L. W. J.; Howell, S. B., Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clinical Cancer Research* **2004**, 10, (19), 6744-6749.
119. Song, I. S.; Savaraj, N.; Siddik, Z. H.; Liu, P. M.; Wei, Y. J.; Wu, C. J.; Kuo, M. T., Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, 3, (12), 1543-1549.
120. Rabik, C. A.; Maryon, E. B.; Kasza, K.; Shafer, J. T.; Bartnik, C. M.; Dolan, M. E., Role of copper transporters in resistance to platinating agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2009**, 64, (1), 133-142.
121. Holzer, A. K.; Manorek, G. H.; Howell, S. B., Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular Pharmacology* **2006**, 70, (4), 1390-1394.
122. Nakayama, K.; Miyazaki, K.; Kanzaki, A.; Fukumoto, M.; Takebayashi, Y., Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines. *Oncology Reports* **2001**, 8, (6), 1285-1287.
123. Katano, K.; Kondo, A.; Safaei, R.; Holzer, A.; Samimi, G.; Mishima, M.; Kuo, Y. M.; Rochdi, M.; Howell, S. B., Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Research* **2002**, 62, (22), 6559-6565.

124. Samimi, G.; Safaei, R.; Katano, K.; Holzer, A. K.; Rochdi, M.; Tomioka, M.; Goodman, M.; Howell, S. B., Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clinical Cancer Research* **2004**, 10, (14), 4661-4669.
125. Liedert, B.; Materna, V.; Schadendorf, D.; Thomale, J.; Lage, H., Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G(2)-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *Journal of Investigative Dermatology* **2003**, 121, (1), 172-176.
126. Chen, K. G.; Valencia, J. C.; Lai, B.; Zhang, G. F.; Paterson, J. K.; Rouzaud, F.; Berens, W.; Wincovitch, S. M.; Garfield, S. H.; Leapman, R. D.; Hearing, V. J.; Gottesman, M. M., Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, (26), 9903-9907.
127. Centerwall, C. R.; Tacka, K. A.; Kerwood, D. J.; Goodisman, J.; Toms, B. B.; Dubowy, R. L.; Dabrowiak, J. C., Modification and uptake of a cisplatin carbonato complex by Jurkat cells. *Molecular Pharmacology* **2006**, 70, (1), 348-355.
128. Esteban-Fernandez, D.; Canas, B.; Pizarro, I.; Palacios, M. A.; Gomez-Gomez, M. M., SEC-ICP-MS and ESI-MS as tools to study the interaction between cisplatin and cytosolic biomolecules. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2007**, 22, (9), 1113-1121.
129. Goto, S.; Kamada, K.; Soh, Y.; Ihara, Y.; Kondo, T., Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs. *Japanese Journal of Cancer Research* **2002**, 93, (9), 1047-1056.
130. Byun, S.-S.; Kim, S. W.; Choi, H.; Lee, C.; Lee, E., Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU International* **2005**, 95, (7), 1086-1090.
131. Godwin, A. K.; Meister, A.; Odwyer, P. J.; Huang, C. S.; Hamilton, T. C.; Anderson, M. E., High-Resistance to Cisplatin in Human Ovarian-Cancer Cell-Lines Is Associated with Marked Increase of Glutathione Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, (7), 3070-3074.
132. Bracht, K.; Boubakari; Grunert, R.; Bednarski, P. J., Correlations between the activities of 19 anti-tumor agents and the intracellular glutathione concentrations in a panel of 14 human cancer cell lines: comparisons with the National Cancer Institute data. *Anti-Cancer Drugs* **2006**, 17, (1), 41-51.
133. Chen, H. H. W.; Song, I. S.; Hossain, A.; Choi, M. K.; Yamane, Y.; Liang, Z. D.; Lu, J.; Wu, L. Y. H.; Siddik, Z. H.; Klomp, L. W. J.; Savaraj, N.; Kuo, M. T., Elevated glutathione levels confer cellular sensitization to cisplatin toxicity by up-regulation of copper transporter hCtr1. *Molecular Pharmacology* **2008**, 74, (3), 697-704.
134. Bell, S. G.; Vallee, B. L., The Metallothionein/Thionein System: An Oxidoreductive Metabolic Zinc Link. *ChemBioChem* **2009**, 10, (1), 55-62.
135. Maret, W., Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, 16, (7), 1079-1086.
136. Kelley, S. L.; Basu, A.; Teicher, B. A.; Hacker, M. P.; Hamer, D. H.; Lazo, J. S., Overexpression of Metallothionein Confers Resistance to Anticancer Drugs. *Science* **1988**, 241, (4874), 1813-1815.
137. Holford, J.; Beale, P. J.; Boxall, F. E.; Sharp, S. Y.; Kelland, L. R., Mechanisms of drug resistance to the platinum complex ZD0473 in ovarian cancer cell lines. *European Journal of Cancer* **2000**, 36, (15), 1984-1990.
138. Toyoda, H.; Mizushima, T.; Satoh, M.; Iizuka, N.; Nomoto, A.; Chiba, H.; Mita, M.; Naganuma, A.; Himeno, S.; Imura, N., HeLa cell transformants overproducing mouse metallothionein show in vivo resistance to cis-platinum in nude mice. *Japanese Journal of Cancer Research* **2000**, 91, (1), 91-8.
139. Ferry, K. V.; Hamilton, T. C.; Johnson, S. W., Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells - Role of ERCC1-XPF. *Biochemical Pharmacology* **2000**, 60, (9), 1305-1313.

140. Chang, I. Y.; Kim, M. H.; Kim, H. B.; Lee, D. Y.; Kim, S. H.; Kim, H. Y.; You, H. J., Small interfering RNA-induced suppression of ERM enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 327, (1), 225-233.
141. Aebi, S.; KurdiHaidar, B.; Gordon, R.; Cenni, B.; Zheng, H.; Fink, D.; Christen, R. D.; Boland, C. R.; Koi, M.; Fishel, R.; Howell, S. B., Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Research* **1996**, 56, (13), 3087-3090.
142. Gifford, G.; Paul, J.; Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Brown, R.; Clinical, S. G., The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research* **2004**, 10, (13), 4420-4426.
143. Gadducci, A.; Cosio, S.; Muraca, S.; Genazzani, A. R., Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *European Journal of Gynaecological Oncology* **2002**, 23, (5), 390-396.
144. Yao, X.; Panichpisal, K.; Kurtzman, N.; Nugent, K., Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *The American Journal of the Medical Sciences* **2007**, 334, (2), 115-124 10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e.
145. Kim, S. W.; Lee, J. U.; Nah, M. Y.; Kang, D. G.; Ahn, K. Y.; Lee, H. S.; Choi, K. C., Cisplatin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* **2001**, 12, (5), 875-882.
146. Pabla, N.; Dong, Z., Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* **2008**, 73, (9), 994-1007.
147. Kuhlmann, M. K.; Burkhardt, G.; Kohler, H., Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrology Dialysis Transplantation* **1997**, 12, (12), 2478-2480.
148. Yonezawa, A.; Inui, K.-i., Organic cation transporter OCT/SLC22A and H⁺/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochemical Pharmacology* **2011**, 81, (5), 563-568.
149. Ciarimboli, G.; Deuster, D.; Knief, A.; Sperling, M.; Holtkamp, M.; Edemir, B.; Pavenstädt, H.; Lanvers-Kaminsky, C.; am Zehnhoff-Dinnesen, A.; Schinkel, A. H.; Koepsell, H.; Jürgens, H.; Schlatter, E., Organic Cation Transporter 2 Mediates Cisplatin-Induced Oto- and Nephrotoxicity and Is a Target for Protective Interventions. *The American journal of pathology* **2010**, 176, (3), 1169-1180.
150. Yokoo, S.; Yonezawa, A.; Masuda, S.; Fukatsu, A.; Katsura, T.; Inui, K.-I., Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology* **2007**, 74, (3), 477-487.
151. Ciarimboli, G.; Ludwig, T.; Lang, D.; Pavenstädt, H.; Koepsell, H.; Piechota, H.-J.; Haier, J.; Jaehde, U.; Zisowsky, J.; Schlatter, E., Cisplatin Nephrotoxicity Is Critically Mediated via the Human Organic Cation Transporter 2. *The American journal of pathology* **2005**, 167, (6), 1477-1484.
152. Pabla, N.; Murphy, R. F.; Liu, K.; Dong, Z., The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **2009**, 296, (3), F505-F511.
153. Kirkham, M.; Parton, R. G., Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers (vol 1744, pg 273, 2005). *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **2005**, 1746, (3), 349-363.
154. Townsend, D. M.; Deng, M.; Zhang, L.; Lapus, M. G.; Hanigan, M. H., Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology* **2003**, 14, (1), 1-10.
155. Ramesh, G.; Reeves, W. B., TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2003**, 285, (4), F610-F618.
156. Cornelison, T. L.; Reed, E., Nephrotoxicity and Hydration Management for Cisplatin, Carboplatin, and Ormaplatin. *Gynecologic Oncology* **1993**, 50, (2), 147-158.

157. Townsend, D. M.; Hanigan, M. H., Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, 300, (1), 142-148.
158. Sadzuka, Y.; Shimizu, Y.; Takino, Y.; Hirota, S., Protection against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in the Rat by Inducers and an Inhibitor of Glutathione-S-Transferase. *Biochemical Pharmacology* **1994**, 48, (3), 453-459.
159. Katsuda, H.; Yamashita, M.; Katsura, H.; Yu, J.; Waki, Y.; Nagata, N.; Sai, Y.; Miyamoto, K., Protecting Cisplatin-Induced Nephrotoxicity with Cimetidine Does Not Affect Antitumor Activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2010**, 33, (11), 1867-1871.
160. Thomas, M. C.; Tikellis, C.; Kantharidis, P.; Burns, W. C.; Cooper, M. E.; Forbes, J. M., The role of advanced glycation in reduced organic cation transport associated with experimental diabetes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, 311, (2), 456-66.
161. Kröning, R.; Lichtenstein, A. K.; Nagami, G. T., Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2000**, 45, (1), 43-49.
162. Tsuruya, K.; Ninomiya, T.; Tokumoto, M.; Hirakawa, M.; Masutani, K.; Taniguchi, M.; Fukuda, K.; Kanai, H.; Kishihara, K.; Hirakata, H.; Iida, M., Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int* **2003**, 63, (1), 72-82.
163. Wei, Q.; Dong, G.; Franklin, J.; Dong, Z., The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney International* **2007**, 72, (1), 53-62.
164. Faubel, S.; Ljubanovic, D.; Reznikov, L.; Somerset, H.; Dinarello, C. A.; Edelstein, C. L., Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney International* **2004**, 66, (6), 2202-2213.
165. Yu, F.; Megyesi, J.; Safirstein, R. L.; Price, P. M., Identification of the functional domain of p21(WAF1/CIP1) that protects cells from cisplatin cytotoxicity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2005**, 289, (3), F514-F520.
166. Wei, Q. Q.; Dong, G.; Yang, T. X.; Megyesi, J.; Price, P. M.; Dong, Z., Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2007**, 293, (4), F1282-F1291.
167. Arany, I.; Megyesi, J. K.; Kaneto, H.; Tanaka, S.; Safirstein, R. L., Activation of ERK or inhibition of JNK ameliorates H₂O₂ cytotoxicity in mouse renal proximal tubule cells. *Kidney International* **2004**, 65, (4), 1231-1239.
168. Abdelrahman, A. M.; Al Salam, S.; AlMahruqi, A. S.; Al Husseni, I. S.; Mansour, M. A.; Ali, B. H., N-acetylcysteine improves renal hemodynamics in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. *Journal of Applied Toxicology* **2010**, 30, (1), 15-21.
169. Atessahin, A.; Yilmaz, S.; Karahan, I.; Ceribasi, A. O.; Karaoglu, A., Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* **2005**, 212, (2-3), 116-123.
170. Tarladacalisir, Y. T.; Kanter, M.; Uygun, M., Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage: A light and electron microscopic study. *Renal Failure* **2008**, 30, (1), 1-8.
171. Maliakel, D. M.; Kagiya, T. V.; Nair, C. K. K., Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Experimental and Toxicologic Pathology* **2008**, 60, (6), 521-527.
172. Naziroglu, M.; Karaoglu, A.; Aksoy, A. O., Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* **2004**, 195, (2-3), 221-230.
173. Francescato, H. D.; Costa, R. S.; Mafalda, S.; Camargo, R.; Zanetti, M. A.; Lavrador, M. A.; Bianchi, M. D. P., Effect of oral selenium administration on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research* **2001**, 43, (1), 77-82.

174. Camargo, S. M. R.; Francescato, H. D. C.; Lavrador, M. A. S.; Bianchi, M. L. P., Oral administration of sodium selenite minimizes cisplatin toxicity on proximal tubules of rats. *Biological Trace Element Research* **2001**, 83, (3), 251-262.
175. Sieja, K., Protective role of selenium against the toxicity of multi-drug chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Pharmazie* **2000**, 55, (12), 958-959.
176. García Sar, D.; Montes-Bayón, M.; Blanco González, E.; Sierra Zapico, L. M.; Sanz-Medel, A., Reduction of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Vivo by Selenomethionine: The Effect on Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Research in Toxicology* **2011**, 24, (6), 896-904.
177. Rooseboom, M.; Schaaf, G.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E.; Fink-Gremmels, J., beta-lyase-dependent attenuation of cisplatin-mediated toxicity by selenocysteine Se-conjugates in renal tubular cell lines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, 301, (3), 884-892.
178. Sener, G.; Satioglu, H.; Kabasakal, L.; Arbak, S.; Oner, S.; Ercan, F.; Keyer-Uysal, M., The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2000**, 14, (6), 553-560.
179. Yuce, A.; Atessahin, A.; Ceribasi, A. O.; Aksakal, M., Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2007**, 101, (5), 345-349.
180. Atessahin, A.; Ceribasi, A. O.; Yuce, A.; Bulmas, O.; Cikim, G., Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2007**, 100, 121-126.
181. Mora, L. D.; Antunes, L. M. G.; Francescato, H. D.; Bianchi, M. D. P., The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research* **2003**, 47, (6), 517-522.
182. Ma, S. F.; Nishikawa, M.; Hyoudou, K.; Takahashi, R.; Ikemura, M.; Kobayashi, Y.; Yamashita, F.; Hashida, M., Combining cisplatin with cationized catalase decreases nephrotoxicity while improving antitumor activity. *Kidney International* **2007**, 72, (12), 1474-1482.
183. Hartmann, J. T.; Knop, S.; Fels, L. M.; van Vangerow, A.; Stolte, H.; Kanz, L.; Bokemeyer, C., The use of reduced doses of amifostine to ameliorate nephrotoxicity of cisplatin/ifosfamide-based chemotherapy in patients with solid tumors. *Anti-Cancer Drugs* **2000**, 11, (1), 1-6.
184. Ramesh, G.; Reeves, W. B., Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor-alpha. *Kidney International* **2004**, 65, (2), 490-498.
185. Deng, J. P.; Kohda, Y.; Chiao, H.; Wang, Y. Q.; Hu, X. H.; Hewitt, S. M.; Miyaji, T.; McLeroy, P.; Nibhanupudy, B.; Li, S. J.; Star, R. A., Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney International* **2001**, 60, (6), 2118-2128.
186. Nagothu, K. K.; Bhatt, R.; Kaushal, G. P.; Portilla, D., Fibrate prevents cisplatin-induced proximal tubule cell death. *Kidney International* **2005**, 68, (6), 2680-2693.
187. Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D., Antitumor platinum compounds. Relationship between structure and activity. *Platinum Metals Review* **1973**, 17, (1), 2-13.
188. Knox, R. J.; Friedlos, F.; Lydall, D. A.; Roberts, J. J., Mechanism of Cytotoxicity of Anticancer Platinum Drugs - Evidence That Cis-Diamminedichloroplatinum(II) and Cis-Diammine-(1,1-Cyclobutanedicarboxylato)Platinum(II) Differ Only in the Kinetics of Their Interaction with DNA. *Cancer Research* **1986**, 46, (4), 1972-1979.
189. Boulikas, T.; Vougiouka, M., Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (review). *Oncology Reports* **2003**, 10, (6), 1663-1682.
190. Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J.; Cvitkovic, E., Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Molecular Cancer Therapeutics* **2002**, 1, (3), 227-235.
191. Levi, F.; Misset, J. L.; Brienza, S.; Adam, R.; Metzger, G.; Itzakhi, M.; Caussanel, J. P.; Kunstlinger, F.; Lecouturier, S.; Descorpsdeclere, A.; Jasmin, C.; Bismuth, H.; Reinberg, A., A Chronopharmacologic Phase-II Clinical-Trial with 5-Fluorouracil, Folinic Acid, and Oxaliplatin Using an

Ambulatory Multichannel Programmable Pump - High Antitumor Effectiveness against Metastatic Colorectal-Cancer. *Cancer* **1992**, 69, (4), 893-900.

192. Argyriou, A. A.; Polychronopoulos, P.; Iconomou, G.; Chroni, E.; Kalofonos, H. P., A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treatment Reviews* **2008**, 34, (4), 368-377.

193. Graham, J.; Muhsin, M.; Kirkpatrick, P., Oxaliplatin. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, 3, (1), 11-12.

194. Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K., Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: Novel design strategies and innovative analytical approaches. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, 12, (18), 2075-2094.

195. Mross, K.; Meyberg, F.; Fiebig, H. H.; Hamm, K.; Hieber, U.; Aulenbacher, P.; Hossfeld, D. K., Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study with Lobaplatin (D-19466), a New Platinum Complex, after Bolus Administration. *Onkologie* **1992**, 15, (2), 139-146.

196. Limited, A. I., Lobaplatin: D 19466. *Drugs in R&D* **2003**, 4, (6), 369-372.

197. Lee, J. W.; Park, J. K.; Lee, S. H.; Kim, S. Y.; Cho, Y. B.; Kuh, H. J., Anti-tumor activity of heptaplatin in combination with 5-fluorouracil or paclitaxel against human head and neck cancer cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs* **2006**, 17, (4), 377-384.

198. Choy, H., Satraplatin: an orally available platinum analog for the treatment of cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2006**, 6, (7), 973-982.

199. Kelland, L. R., An update on satraplatin: the first orally available platinum anticancer drug. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2000**, 9, (6), 1373-1382.

200. Rice, J. R.; Gerberich, J. L.; Nowotnik, D. P.; Howell, S. B., Preclinical efficacy and pharmacokinetics of AP5346, a novel diaminocyclohexane-platinum tumor-targeting drug delivery system. *Clinical Cancer Research* **2006**, 12, (7), 2248-2254.

201. Boulikas, T., Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncology Reports* **2004**, 12, (1), 3-12.

202. Lovejoy, K. S.; Lippard, S. J., Non-traditional platinum compounds for improved accumulation, oral bioavailability, and tumor targeting. *Dalton Transactions* **2009**, (48), 10651-10659.

203. Williams, R. J. P., Chemical selection of elements by cells. *Coordination Chemistry Reviews* **2001**, 216, 583-595.

204. Szpunar, J., Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, 378, (1), 54-56.

205. Haraguchi, H., Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19, (1), 5-14.

206. Khouzam, R. B.; Lobinski, R.; Pohl, P., Multi-element analysis of bread, cheese, fruit and vegetables by double-focusing sector-field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Methods* **2011**, 3, (9), 2115-2120.

207. Yang, Z.; Hou, X. D.; Jones, B. T., Determination of platinum in clinical samples. *Applied Spectroscopy Reviews* **2002**, 37, (1), 57-88.

208. Szpunar, J., Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* **2005**, 130, (4), 442-465.

209. Fahrni, C. J., Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals. *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, 11, (2), 121-127.

210. Boxer, S. G.; Kraft, M. L.; Weber, P. K., Advances in Imaging Secondary Ion Mass Spectrometry for Biological Samples. *Annual Review of Biophysics* **2009**, 38, 53-74.

211. Ortega, R.; Cloetens, P.; Deves, G.; Carmona, A.; Bohic, S., Iron Storage within Dopamine Neurovesicles Revealed by Chemical Nano-Imaging. *Plos One* **2007**, 2, (9).

212. Bohic, S.; Murphy, K.; Paulus, W.; Cloetens, P.; Salome, M.; Susini, J.; Double, K., Intracellular Chemical Imaging of the Developmental Phases of Human Neuromelanin Using Synchrotron X-ray Microspectroscopy. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (24), 9557-9566.
213. Chandra, S.; Tjarks, W.; Lorey, D. R.; Barth, R. F., Quantitative subcellular imaging of boron compounds in individual mitotic and interphase human glioblastoma cells with imaging secondary ion mass spectrometry (SIMS). *Journal of Microscopy-Oxford* **2008**, 229, (1), 92-103.
214. Galle, P.; Levi-Setti, R.; Lamperti, A.; Bourahla, K.; Escaig, F., Subcellular localization of aluminum and indium in the rat kidney. *Applied Surface Science* **2004**, 231, 475-478.
215. Corde, S.; Biston, M. C.; Elleaume, H.; Estève, F.; Charvet, A. M.; Joubert, A.; Ducros, V.; Bohic, S.; Simionovici, A.; Brochard, T.; Nemoz, C.; Renier, M.; Troprès, I.; Fiedler, S.; Bravin, A.; Thomlinson, W.; Le Bas, J. F.; Balosso, J., Lack of Cell Death Enhancement after Irradiation with Monochromatic Synchrotron X Rays at the K-Shell Edge of Platinum Incorporated in Living SQ20B Human Cells as cis-Diamminedichloroplatinum (II). *Radiation Research* **2002**, 158, (6), 763-770.
216. Ilinski, P.; Lai, B.; Cai, Z. H.; Yun, W. B.; Legnini, D.; Talarico, T.; Cholewa, M.; Webster, L. K.; Deacon, G. B.; Rainone, S.; Phillips, D. R.; Stampfl, A. P. J., The direct mapping of the uptake of platinum anticancer agents in individual human ovarian adenocarcinoma cells using a hard X-ray microprobe. *Cancer Research* **2003**, 63, (8), 1776-1779.
217. Sakurai, H.; Okamoto, M.; Hasegawa, M.; Satoh, T.; Oikawa, M.; Kamiya, T.; Arakawa, K.; Nakano, T., Direct visualization and quantification of the anticancer agent, cis-diamminedichloroplatinum(II), in human lung cancer cells using in-air microparticle-induced X-ray emission analysis. *Cancer Science* **2008**, 99, (5), 901-904.
218. Ortega, R.; Moretto, P.; Fajac, A.; Benard, J.; Llabador, Y.; Simonoff, M., Quantitative mapping of platinum and essential trace metal in cisplatin resistant and sensitive human ovarian adenocarcinoma cells. *Cellular and Molecular Biology* **1996**, 42, (1), 77-88.
219. Hall, M. D.; Alderden, R. A.; Zhang, M.; Beale, P. J.; Cai, Z. H.; Lai, B.; Stampfl, A. P. J.; Hambley, T. W., The fate of platinum(II) and platinum(IV) anti-cancer agents in cancer cells and tumours. *Journal of Structural Biology* **2006**, 155, (1), 38-44.
220. Hall, M. D.; Foran, G. J.; Zhang, M.; Beale, P. J.; Hambley, T. W., XANES determination of the platinum oxidation state distribution in cancer cells treated with platinum(IV) anticancer agents. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (25), 7524-7525.
221. Becker, J. S.; Zoriy, M.; Matusch, A.; Wu, B.; Salber, D.; Palm, C.; Becker, J. S., Bioimaging of Metals by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (La-Icp-MS). *Mass Spectrometry Reviews* **2010**, 29, (1), 156-175.
222. Becker, J. S., Inorganic Mass Spectrometry. In John Wiley and Sons, Ltd: 2007.
223. Qin, Z.; Caruso, J. A.; Lai, B.; Matusch, A.; Becker, J. S., Trace metal imaging with high spatial resolution: Applications in biomedicine. *Metallomics* **2011**, 3, (1), 28-37.
224. Pugh, J. A. T.; Cox, A. G.; McLeod, C. W.; Bunch, J.; Whitby, B.; Gordon, B.; Kalber, T.; White, E., A novel calibration strategy for analysis and imaging of biological thin sections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**.
225. Dobrowolska, J.; Dehnhardt, M.; Matusch, A.; Zoriy, M.; Palomero-Gallagher, N.; Koscielniak, P.; Zilles, K.; Becker, J. S., Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **2008**, 74, (4), 717-723.
226. Sela, H.; Karpas, Z.; Cohen, H.; Zakon, Y.; Zeiri, Y., Preparation of stable standards of biological tissues for laser ablation analysis. *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 307, (1-3), 142-148.
227. Becker, J. S.; Zoriy, M. V.; Pickhardt, C.; Palomero-Gallagher, N.; Zilles, K., Imaging of Copper, Zinc, and Other Elements in Thin Section of Human Brain Samples (Hippocampus) by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (10), 3208-3216.

228. Austin, C.; Fryer, F.; Lear, J.; Bishop, D.; Hare, D.; Rawling, T.; Kirkup, L.; McDonagh, A.; Doble, P., Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissues by LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**, 26, (7), 1494-1501.
229. Becker, J. S.; Matusch, A.; Palm, C.; Salber, D.; Morton, K. A.; Becker, S., Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics. *Metallomics* **2010**, 2, (2), 104-111.
230. Feldmann, J.; Kindness, A.; Ek, P., Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, 17, (8), 813-818.
231. Gholap, D. S.; Izmer, A.; De Samber, B.; van Elteren, J. T.; Selih, V. S.; Evens, R.; De Schampheleere, K.; Janssen, C.; Balcaen, L.; Lindemann, I.; Vincze, L.; Vanhaecke, F., Comparison of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and micro-X-ray fluorescence spectrometry for elemental imaging in *Daphnia magna*. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 664, (1), 19-26.
232. Zoriy, M. V.; Dehnhardt, M.; Reifenger, G.; Zilles, K.; Becker, J. S., Imaging of Cu, Zn, Pb and U in human brain tumor resections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, 257, (1-3), 27-33.
233. Zoriy, M. V.; Dehnhardt, M.; Matusch, A.; Becker, J. S., Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **2008**, 63, (3), 375-382.
234. Becker, J. S.; Breuer, U.; Hsieh, H. F.; Osterholt, T.; Kumtabtim, U.; Wu, B.; Matusch, A.; Caruso, J. A.; Qin, Z. Y., Bioimaging of Metals and Biomolecules in Mouse Heart by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Secondary Ion Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, (22), 9528-9533.
235. Hutchinson, R. W.; Cox, A. G.; McLeod, C. W.; Marshall, P. S.; Harper, A.; Dawson, E. L.; Howlett, D. R., Imaging and spatial distribution of beta-amyloid peptide and metal ions in Alzheimer's plaques by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2005**, 346, (2), 225-233.
236. Wang, L. M.; Becker, J. S.; Wu, Q.; Oliveira, M. F.; Bozza, F. A.; Schwager, A. L.; Hoffman, J. M.; Morton, K. A., Bioimaging of copper alterations in the aging mouse brain by autoradiography, laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and immunohistochemistry. *Metallomics* **2010**, 2, (5), 348-353.
237. Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Mesko, M. F.; Matusch, A.; Becker, J. S., Bioimaging of metals in thin mouse brain section by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: novel online quantification strategy using aqueous standards. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2010**, 25, (11), 1739-1744.
238. Matusch, A.; Depboylu, C.; Palm, C.; Wu, B.; Hoglinger, G. U.; Schafer, M. K. H.; Becker, J. S., Cerebral Bioimaging of Cu, Fe, Zn, and Mn in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, 21, (1), 161-171.
239. Becker, J. S., Bioimaging of metals in brain tissue from micrometre to nanometre scale by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: State of the art and perspectives. *International Journal of Mass Spectrometry* **2010**, 289, (2-3), 65-75.
240. Hare, D. J.; George, J. L.; Grimm, R.; Wilkins, S.; Adlard, P. A.; Cherny, R. A.; Bush, A. I.; Finkelstein, D. I.; Doble, P., Three-dimensional elemental bio-imaging of Fe, Zn, Cu, Mn and P in a 6-hydroxydopamine lesioned mouse brain. *Metallomics* **2010**, 2, (11), 745-753.
241. Hare, D.; Burger, F.; Austin, C.; Fryer, F.; Grimm, R.; Reedy, B.; Scolyer, R. A.; Thompson, J. F.; Doble, P., Elemental bio-imaging of melanoma in lymph node biopsies. *Analyst* **2009**, 134, (3), 450-453.

242. Austin, C.; Hare, D.; Rozelle, A. L.; Robinson, W. H.; Grimm, R.; Doble, P., Elemental bio-imaging of calcium phosphate crystal deposits in knee samples from arthritic patients. *Metallomics* **2009**, 1, (2), 142-147.
243. Wu, B.; Zoriy, M.; Chen, Y. X.; Becker, J. S., Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta* **2009**, 78, (1), 132-137.
244. Becker, J. S.; Matusch, A.; Depboylu, C.; Dobrowolska, J.; Zoriy, M. V., Quantitative Imaging of Selenium, Copper, and Zinc in Thin Sections of Biological Tissues (Slugs–Genus *Arion*) Measured by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (16), 6074-6080.
245. Zoriy, M.; Matusch, A.; Spruss, T.; Becker, J. S., Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc, and platinum in thin sections of a kidney from a mouse treated with cis-platin. *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, 260, (2-3), 102-106.
246. Becker, J. S.; Gorbunoff, A.; Zoriy, M.; Izmer, A.; Kayser, M., Evidence of near-field laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (NF-LA-ICP-MS) at nanometre scale for elemental and isotopic analysis on gels and biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2006**, 21, (1), 19-25.
247. Wu, B.; Niehren, S.; Becker, J. S., Mass spectrometric imaging of elements in biological tissues by new BrainMet technique-laser microdissection inductively coupled plasma mass spectrometry (LMD-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**.
248. Becker, J. S.; Niehren, S.; Matusch, A.; Wu, B.; Hsieh, H. F.; Kumtabtim, U.; Hamester, M.; Plaschke-Schlutter, A.; Salber, D., Scaling down the bioimaging of metals by laser microdissection inductively coupled plasma mass spectrometry (LMD-ICP-MS). *International Journal of Mass Spectrometry* **2010**, 294, (1), 1-6.
249. Terzano, R.; Al Chami, Z.; Vekemans, B.; Janssens, K.; Miano, T.; Ruggiero, P., Zinc distribution and speciation within rocket plants (*Eruca vesicaria* L. Cavaleri) grown on a polluted soil amended with compost as determined by XRF microtomography and Micro-XANES. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, (9), 3222-3231.
250. Montarges-Pelletier, E.; Chardot, V.; Echevarria, G.; Michot, L. J.; Bauer, A.; Morel, J. L., Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: An X-ray spectroscopic study. *Phytochemistry* **2008**, 69, (8), 1695-1709.
251. Shi, W. X.; Punta, M.; Bohon, J.; Sauder, J. M.; D'Mello, R.; Sullivan, M.; Toomey, J.; Abel, D.; Lippi, M.; Passerini, A.; Frasconi, P.; Burley, S. K.; Rost, B.; Chance, M. R., Characterization of metalloproteins by high-throughput X-ray absorption spectroscopy. *Genome Research* **2011**, 21, (6), 898-907.
252. Lobinski, R.; Moulin, C.; Ortega, R., Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie* **2006**, 88, (11), 1591-1604.
253. Becker, J. S.; Jakubowski, N., The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, (7), 1969-1983.
254. Cazares, L.; Troyer, D.; Wang, B.; Drake, R.; John Semmes, O., MALDI tissue imaging: from biomarker discovery to clinical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 401, (1), 17-27.
255. Paizs, B.; Suhai, S., Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, 24, (4), 508-548.
256. Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W., Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (13), 3265-3266.
257. Syka, J. E. P.; Coon, J. J.; Schroeder, M. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F., Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, (26), 9528-9533.

258. Mikesch, L. M.; Ueberheide, B.; Chi, A.; Coon, J. J.; Syka, J. E.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F., The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1764, (12), 1811-22.
259. Good, D. M.; Wirtala, M.; McAlister, G. C.; Coon, J. J., Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, 6, (11), 1942-1951.
260. Wiesner, J.; Premisler, T.; Sickmann, A., Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics* **2008**, 8, (21), 4466-4483.
261. Ordóñez, Y. N.; Montes-Bayon, M.; Blanco-Gonzalez, E.; Sanz-Medel, A., Quantitative Analysis and Simultaneous Activity Measurements of Cu, Zn-Superoxide Dismutase in Red Blood Cells by HPLC-ICPMS. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, (6), 2387-2394.
262. Vujacic, A.; Bugarcic, Z. D.; Schiller, J.; Vasic, V.; Petkovic, M., Matrix-assisted laser desorption and ionisation time-of-flight mass spectrometry of Pt(II) and Pd(II) complexes. *Polyhedron* **2009**, 28, (14), 2905-2912.
263. Zhang, G.; Hu, W.; Du, Z.; Lv, S.; Zheng, W.; Luo, Q.; Li, X.; Wu, K.; Han, Y.; Wang, F., A comparative study on interactions of cisplatin and ruthenium arene anticancer complexes with metallothionein using MALDI-TOF-MS. *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 307, (1-3), 79-84.
264. Gabbiani, C.; Mastrobuoni, G.; Sorrentino, F.; Dani, B.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Cinellu, M. A.; Pieraccini, G.; Messori, L.; Casini, A., Thioredoxin reductase, an emerging target for anticancer metallodrugs. Enzyme inhibition by cytotoxic gold(III) compounds studied with combined mass spectrometry and biochemical assays. *MedChemComm* **2011**, 2, (1), 50-54.
265. Ang, W. H.; Daldini, E.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J., Strategy to tether organometallic ruthenium-arene anticancer compounds to recombinant human serum albumin. *Inorganic Chemistry* **2007**, 46, (22), 9048-9050.
266. Gregorius, B.; Schaumlöffel, D.; Hildebrandt, A.; Tholey, A., Characterization of metal-labelled peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, 24, (22), 3279-3289.
267. Timerbaev, A. R.; Pawlak, K.; Gabbiani, C.; Messori, L., Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, 30, (7), 1120-1138.
268. Miao, R.; Yang, G. S.; Miao, Y.; Mei, Y. H.; Hong, J.; Zhao, C. M.; Zhu, L. G., Interactions of platinum(II) complexes with sulfur-containing peptides studied by electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, 19, (8), 1031-1040.
269. Peng, J.; Mandal, R.; Sawyer, M.; Li, X. F., Characterization of intact hemoglobin and oxaliplatin interaction by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **2005**, 51, (12), 2274-2281.
270. Mandal, R.; Li, X.-F., Top-down characterization of proteins and drug-protein complexes using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, 20, (1), 48-52.
271. Casini, A.; Gabbiani, C.; Michelucci, E.; Pieraccini, G.; Moneti, G.; Dyson, P.; Messori, L., Exploring metallodrug-protein interactions by mass spectrometry: comparisons between platinum coordination complexes and an organometallic ruthenium compound. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2009**, 14, (5), 761-770.
272. Hagemester, T.; Linscheid, M., Mass spectrometry of cis-diamminedichloroplatinum(II) adducts with the dinucleosidemonophosphates d(ApG), d(GpG) and d(TpC) in an ion trap. *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, 37, (7), 731-747.
273. Rogers, D. A.; Ray, S. J.; Hieftje, G. M., An electrospray/inductively coupled plasma dual-source time-of-flight mass spectrometer for rapid metallomic and speciation analysis: instrument design. *Metallomics* **2009**, 1, (1), 67-77.

274. Martino, F. A. R.; Sanchez, M. L. F.; Sanz-Medel, A., The potential of double focusing-ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milks. *Analytica Chimica Acta* **2001**, 442, (2), 191-200.
275. Boulyga, S. F.; Loreti, V.; Bettmer, B.; Heumann, K. G., Application of SEC-ICP-MS for comparative analyses of metal-containing species in cancerous and healthy human thyroid samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, 380, (2), 198-203.
276. Infante, H. G.; Van Campenhout, K.; Blust, R.; Adams, F. C., Inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry coupled to high-performance liquid chromatography for multi-elemental speciation analysis of metalloproteins in carp cytosols. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, 17, (2), 79-87.
277. De Smet, H.; De Wachter, B.; Lobinski, R.; Blust, R., Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* **2001**, 52, (3-4), 269-281.
278. Gonzalez-Fernandez, M.; Garcia-Sevillano, M. A.; Jara-Biedma, R.; Garcia-Barrera, T.; Vioque, A.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C.; Gomez-Ariza, J. L., Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**, 26, (1), 141-149.
279. Esteban-Fernandez, D.; Gomez-Gomez, M. M.; Canas, B.; Verdaguer, J. M.; Ramirez, R.; Palacios, M. A., Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues. *Talanta* **2007**, 72, (2), 768-773.
280. Rodríguez-Fariñas, N.; Gomez-Gomez, M.; Camara-Rica, C., Study of tungstate-protein interaction in human serum by LC-ICP-MS and MALDI-TOF. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 390, (1), 29-35.
281. Groessl, M.; Terenghi, M.; Casini, A.; Elviri, L.; Lobinski, R.; Dyson, P. J., Reactivity of anticancer metallodrugs with serum proteins: new insights from size exclusion chromatography-ICP-MS and ESI-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2010**, 25, (3), 305-313.
282. Mandal, R.; Teixeira, C.; Li, X. F., Studies of cisplatin and hemoglobin interactions using nanospray mass spectrometry and liquid chromatography with inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* **2003**, 128, (6), 629-634.
283. Bouyssiere, B.; Knispel, T.; Ruhnau, C.; Denkhau, E.; Prange, A., Analysis of nickel species in cytosols of normal and malignant human colonic tissues using two dimensional liquid chromatography with ICP-sector field MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19, (1), 196-200.
284. Polec, K.; Perez-Calvo, M.; Garcia-Arribas, O.; Szpunar, J.; Ribas-Ozonas, B.; Lobinski, R., Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, 88, (2), 197-206.
285. Dernovics, M.; Lobinski, R., Speciation analysis of selenium metabolites in yeast-based food supplements by ICPMS - Assisted hydrophilic interaction HPLC - Hybrid linear ion trap/orbitrap MS(n). *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (11), 3975-3984.
286. Ouerdane, L.; Mari, S.; Czernic, P.; Lebrun, M.; Lobinski, R., Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2006**, 21, (7), 676-683.
287. Schaumlöffel, D.; Ruiz Encinar, J.; Lobinski, R., Development of a sheathless interface between reversed-phase capillary HPLC and ICPMS via a microflow total consumption nebulizer for selenopeptide mapping. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (24), 6837-42.
288. Rappel, C.; Schaumlöffel, D., Improved nanonebulizer design for the coupling of nanoHPLC with ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2010**, 25, (12), 1963-1968.
289. Giusti, P.; Lobinski, R.; Szpunar, J.; Schaumlöffel, D., Development of a Nebulizer for a Sheathless Interfacing of NanoHPLC and ICPMS. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (3), 965-971.

290. Polec, K.; Garcia-Arribas, O.; Perez-Calvo, M.; Szpunar, J.; Ribas-Ozonas, B.; Lobinski, R., Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2000**, 15, (10), 1363-1368.
291. Far, J.; Preud'homme, H.; Lobinski, R., Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion-microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS detection. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 657, (2), 175-190.
292. Dernovics, M.; Far, J.; Lobinski, R., Identification of anionic selenium species in Se-rich yeast by electrospray QTOF MS/MS and hybrid linear ion trap/orbitrap MS(n). *Metallomics* **2009**, 1, (4), 317-329.
293. Dernovics, M.; Giusti, P.; Lobinski, R., ICP-MS-assisted nanoHPLC-electrospray Q/time-of-flight MS/MS selenopeptide mapping in Brazil nuts. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2007**, 22, (1), 41-50.
294. Giusti, P.; Schaumlöffel, D.; Preud'homme, H.; Szpunar, J.; Lobinski, R., Selenopeptide mapping in a selenium-yeast protein digest by parallel nanoHPLC-ICP-MS and nanoHPLC-electrospray-MS/MS after on-line preconcentration. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2006**, 21, (1), 26-32.
295. Sar, D. G.; Montes-Bayon, M.; Gonzalez, E. B.; Sierra, L. M.; Aguado, L.; Comendador, M. A.; Koellensperger, G.; Hann, S.; Sanz-Medel, A., Quantitative Profiling of in Vivo Generated Cisplatin-DNA Adducts Using Different Isotope Dilution Strategies. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, (23), 9553-9560.
296. Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R., Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, (4), 1119-1138.
297. Lobinski, R.; Becker, J. S.; Haraguchi, H.; Sarkar, B., Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2010**, 82, (2), 493-504.
298. Schaumlöffel, D.; Prange, A., A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1999**, 364, (5), 452-456.
299. Timerbaev, A. R.; Keppler, B. K., Capillary electrophoresis of metal-based drugs. *Analytical Biochemistry* **2007**, 369, (1), 1-7.
300. Timerbaev, A. R.; Rudnev, A. V.; Semenova, O.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K., Comparative binding of antitumor indazolium [trans-tetrachlorobis(1H-indazole) ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **2005**, 341, (2), 326-333.
301. Rudnev, A. V.; Aleksenko, S. S.; Semenova, O.; Hartinger, C. G.; Timerbaev, A. R.; Keppler, B. K., Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method. *Journal of Separation Science* **2005**, 28, (2), 121-127.
302. Rudnev, A. V.; Foteeva, L. S.; Kowol, C.; Berger, R.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Timerbaev, A. R.; Keppler, B. K., Preclinical characterization of anticancer gallium(III) complexes: Solubility, stability, lipophilicity and binding to serum proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, 100, (11), 1819-1826.
303. Hagege, A.; Baldinger, T.; Martin-Jouet, M.; Zal, F.; Leroy, M.; Leize, E.; Van Dorselaer, A., Assessment of the contribution of inductively coupled plasma mass spectrometry to metalloprotein analysis: a novel approach for studies of multiproteic complexes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, 18, (6), 735-738.
304. Schaumlöffel, D.; Ouerdane, L.; Bouyssi re, B.; Lobinski, R., Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP MS and electrospray MS-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, 18, (2), 120-127.
305. Polec-Pawlak, K.; Schaumlöffel, D.; Szpunar, J.; Prange, A.; Lobinski, R., Analysis for metal complexes with metallothionein in rat liver by capillary zone electrophoresis using ICP double-focussing sector-field isotope dilution MS and electrospray MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, 17, (8), 908-912.

306. Schaumloffel, D.; Prange, A.; Marx, G.; Heumann, K. G.; Bratter, P., Characterization and quantification of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-isotope-dilution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, 372, (1), 155-163.
307. Timerbaev, A. R.; Aleksenko, K. S.; Polec-Pawlak, K.; Ruzik, R.; Semenova, O.; Hartinger, C. G.; Oszwaldowski, S.; Galanski, M.; Jarosz, M.; Keppler, B. K., Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin. *Electrophoresis* **2004**, 25, (13), 1988-1995.
308. Warnke, U.; Rappel, C.; Meier, H.; Kloft, C.; Galanski, M.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Jaehde, U., Analysis of platinum adducts with DNA nucleotides and nucleosides by capillary electrophoresis coupled to ESI-MS: Indications of guanosine 5'-monophosphate O-6-N7 chelation. *ChemBioChem* **2004**, 5, (11), 1543-1549.
309. Mounicou, S.; Vacchina, V.; Szpunar, J.; Potin-Gautier, M.; Lobinski, R., Determination of phytochelators by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* **2001**, 126, (5), 624-632.
310. Raab, A.; Ploselli, B.; Munro, C.; Thomas-Oates, J.; Feldmann, J., Evaluation of gel electrophoresis conditions for the separation of metal-tagged proteins with subsequent laser ablation ICP-MS detection. *Electrophoresis* **2009**, 30, (2), 303-314.
311. Ma, R. L.; McLeod, C. W.; Tomlinson, K.; Poole, R. K., Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry. *Electrophoresis* **2004**, 25, (15), 2469-2477.
312. Schmidt, A.-C.; Störr, B.; Kummer, N.-A., Influence of one- and two-dimensional gel electrophoresis procedure on metal-protein bindings examined by electrospray ionization mass spectrometry, inductively coupled plasma mass spectrometry, and ultrafiltration. *Talanta* **2011**, 85, (2), 1118-1128.
313. Tastet, L.; Schaumloffel, D.; Bouyssiere, B.; Lobinski, R., Identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast aqueous extract by 2D gel electrophoresis, nanoHPLC-ICP MS and nanoHPLC-ESI MS/MS. *Talanta* **2008**, 75, (4), 1140-1145.
314. Ballihaut, G.; Claverie, F.; Pecheyran, C.; Mounicou, S.; Grimaud, R.; Lobinski, R., Sensitive detection of selenoproteins in gel electrophoresis by high repetition rate femtosecond laser ablation. inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (17), 6874-6880.
315. Tastet, L.; Schaumloffel, D.; Bouyssiere, B.; Lobinski, R., Capillary HPLC-ICP MS mapping of selenocompounds in spots obtained from the 2-D gel electrophoresis of the water-soluble protein fraction of selenized yeast. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 385, (5), 948-953.
316. Bianga, J.; Ballihaut, G.; Pecheyran, C.; Touat, Z.; Preud'homme, H.; Mounicou, S.; Chavatte, L.; Lobinski, R.; Szpunar, J., Detection of selenoproteins in human cell extracts by laser ablation-ICP MS after separation by polyacrylamide gel electrophoresis and blotting. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2012**, 27, (1), 25-32.
317. Becker, J. S.; Przybylski, M., Studies of structure and phosphorylation of tau protein using high resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2007**, 22, (7), 761-765.
318. Krause-Buchholz, U.; Becker, J. S.; Zoriy, M.; Pickhardt, C.; Przybylski, M.; Rodel, G.; Becker, J. S., Detection of phosphorylated subunits by combined LA-ICP-MS and MALDI-FTICR-MS analysis in yeast mitochondrial membrane complexes separated by blue native/SDS-PAGE. *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, 248, (1-2), 56-60.
319. Becker, J. S.; Zoriy, M.; Becker, J. S.; Pickhardt, C.; Damoc, E.; Juhacz, G.; Palkovits, M.; Przybylski, M., Determination of phosphorus-, copper-, and zinc-containing human brain proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (18), 5851-5860.
320. Becker, J. S.; Zoriy, M.; Krause-Buchholz, U.; Becker, J. S.; Pickhardt, C.; Przybylski, M.; Pompe, W.; Rodel, G., In-gel screening of phosphorus and copper, zinc and iron in proteins of yeast mitochondria by LA-ICP-MS and identification of phosphorylated protein structures by MALDI-FT-ICR-

MS after separation with two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19, (9), 1236-1243.

321. Becker, J. S.; Zoriy, M.; Becker, J. S.; Pickhardt, C.; Przybylski, M., Determination of phosphorus and metals in human brain proteins after isolation by gel electrophoresis by laser ablation inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19, (1), 149-152.

322. Becker, J. S.; Pozebon, D.; Matusch, A.; Dressler, V. L.; Becker, J. S., Detection of Zn-containing proteins in slug (Genus Anon) tissue using laser ablation ICP-MS after separation by gel electrophoresis. *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 307, (1-3), 66-69.

323. Chevreux, S.; Roudeau, S.; Fraysse, A.; Carmona, A.; Deves, G.; Solari, P. L.; Mounicou, S.; Lobinski, R.; Ortega, R., Multimodal analysis of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms separated on electrophoresis gels. *Biochimie* **2009**, 91, (10), 1324-1327.

324. Becker, J. S.; Lobinski, R.; Becker, J. S., Metal imaging in non-denaturing 2D electrophoresis gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the detection of metalloproteins. *Metallomics* **2009**, 1, (4), 312-316.

325. Becker, J. S.; Mounicou, S.; Zoriy, M. V.; Becker, J. S.; Lobinski, R., Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta* **2008**, 76, (5), 1183-1188.

326. Becker, J. S.; Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Lobinski, R.; Becker, J. S., LA-ICP-MS studies of zinc exchange by copper in bovine serum albumin using an isotopic enriched copper tracer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2008**, 23, (8), 1076-1082.

327. Neilsen, J. L.; Abildtrup, A.; Christensen, J.; Watson, P.; Cox, A.; McLeod, C. W., Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **1998**, 53, (2), 339-345.

328. Brüchert, W.; Bettmer, J., On-Line Coupling of Gel Electrophoresis and Inductively Coupled Plasma-Sector Field-Mass Spectrometry for the Determination of dsDNA Fragments. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (15), 5072-5075.

329. Haider, S. R.; Sharp, B. L.; Reid, H. J., On-line coupling of gel electrophoresis and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, 30, (11), 1793-1808.

330. Sussulini, A.; Kratzin, H.; Jahn, O.; Banzato, C. E. M.; Arruda, M. A. Z.; Becker, J. S., Metallomics Studies of Human Blood Serum from Treated Bipolar Disorder Patients. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, (13), 5859-5864.

331. Ballihaut, G.; Pecheyran, C.; Mounicou, S.; Preud'homme, H.; Grimaud, R.; Lobinski, R., Multimode detection (LA-ICP-MS, MALDI-MS and nanoHPLC-ESI-MS2) in 1D and 2D gel electrophoresis for selenium-containing proteins. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2007**, 26, (3), 183-190.

332. Pedrero, Z.; Murillo, S.; Camara, C.; Schram, E.; Luten, J. B.; Feldmann, I.; Jakubowski, N.; Madrid, Y., Selenium speciation in different organs of African catfish (*Clarias gariepinus*) enriched through a selenium-enriched garlic based diet. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**, 26, (1), 116-125.

333. Pedrero, Z.; Madrid, Y.; Camara, C.; Schram, E.; Luten, J. B.; Feldmann, I.; Waentig, L.; Hayen, H.; Jakubowski, N., Screening of selenium containing proteins in the Tris-buffer soluble fraction of African catfish (*Clarias gariepinus*) fillets by laser ablation-ICP-MS after SDS-PAGE and electroblotting onto membranes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2009**, 24, (6), 775-784.

334. Fricker, M. B.; Kutscher, D.; Aeschlimann, B.; Frommer, J.; Dietiker, R.; Bettmer, J.; Günther, D., High spatial resolution trace element analysis by LA-ICP-MS using a novel ablation cell for multiple or large samples. *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 307, (1-3), 39-45.

335. Binet, M. R. B.; Ma, R. L.; McLeod, C. W.; Poole, R. K., Detection and characterization of zinc- and cadmium-binding proteins in *Escherichia coli* by gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2003**, 318, (1), 30-38.
336. Chery, C. C.; Gunther, D.; Cornelis, R.; Vanhaecke, F.; Moens, L., Detection of metals in proteins by means of polyacrylamide gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Application to selenium. *Electrophoresis* **2003**, 24, (19-20), 3305-3313.
337. Wind, M.; Feldmann, I.; Jakubowski, N.; Lehmann, W. D., Spotting and quantification of phosphoproteins purified by gel electrophoresis and laser ablation-element mass spectrometry with phosphorus-31 detection. *Electrophoresis* **2003**, 24, (7-8), 1276-1280.
338. Becker, J. S.; Boulyga, S. F.; Becker, J. S.; Pickhardt, C.; Damoc, E.; Przybylski, M., Structural identification and quantification of protein phosphorylations after gel electrophoretic separation using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 228, (2-3), 985-997.
339. Becker, J. S.; Zoriy, M.; Pickhardt, C.; Przybylski, M.; Becker, J. S., Investigation of Cu-, Zn- and Fe-containing human brain proteins using isotopic-enriched tracers by LA-ICP-MS and MALDI-FT-ICR-MS. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, 242, (2-3), 135-144.
340. Khalaila, I.; Bergamo, A.; Bussy, F.; Sava, G.; Dyson, P. J., The role of cisplatin and NAMI-A plasma-protein interactions in relation to combination therapy. *International Journal of Oncology* **2006**, 29, (1), 261-268.
341. Lustig, S.; De Kimpe, J.; Cornelis, R.; Schramel, P.; Michalke, B., Platinum speciation in clinical and environmental samples: Scrutiny of data obtained by using electrophoresis techniques (flatbed and capillary). *Electrophoresis* **1999**, 20, (7), 1627-1633.
342. Sarka, B.-G., Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22, (5), 273-281.
343. Delahunty, C. M.; Yates, J. R., MudPIT: multidimensional protein identification technology. *Biotechniques* **2007**, 43, (5), 563-+.
344. Han, X. M.; Jin, M.; Breuker, K.; McLafferty, F. W., Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science* **2006**, 314, (5796), 109-112.
345. Garcia, B. A.; Siuti, N.; Thomas, C. E.; Mizzen, C. A.; Kelleher, N. L., Characterization of neurohistone variants and post-translational modifications by electron capture dissociation mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, 259, (1-3), 184-196.
346. Han, X.; Aslanian, A.; Yates Iii, J. R., Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, 12, (5), 483-490.
347. Parks, B. A.; Jiang, L.; Thomas, P. M.; Wenger, C. D.; Roth, M. J.; Boyne, M. T.; Burke, P. V.; Kwast, K. E.; Kelleher, N. L., Top-down proteomics on a chromatographic time scale using linear ion trap Fourier transform hybrid mass spectrometers. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (21), 7984-7991.
348. Lopez-Ferrer, D.; Capelo, J. L.; Vazquez, J., Ultra fast trypsin digestion of proteins by high intensity focused ultrasound. *Journal of Proteome Research* **2005**, 4, (5), 1569-1574.
349. Birnbaum, J.; Kahan, F. M.; Kropp, H.; Macdonald, J. S., Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem/cilastatin. *The American Journal of Medicine* **1985**, 78, (6, Supplement 1), 3-21.
350. Nakamura, T.; Kokuryo, T.; Hashimoto, Y.; Inui, K.-I., Effects of Fosfomycin and Imipenem-Cilastatin on the Nephrotoxicity of Vancomycin and Cisplatin in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1999**, 51, (2), 227-232.
351. Pérez, M.; Castilla, M.; Torres, A. M.; Lázaro, J. A.; Sarmiento, E.; Tejedor, A., Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2004**, 19, (10), 2445-2455.

352. Sheikh-Hamad, D.; Cacini, W.; Buckley, A.; Isaac, J.; Truong, L.; Tsao, C.; Kishore, B., Cellular and molecular studies on cisplatin-induced apoptotic cell death in rat kidney. *Archives of Toxicology* **2004**, 78, (3), 147-155.
353. Kroning, R.; Katz, D.; Lichtenstein, A. K.; Nagami, G. T., Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *Br J Cancer* **1999**, 79, (2), 293-299.
354. Sharma, R. P., Interactions of Cis-Platinum with Cellular Zinc and Copper in Rat-Liver and Kidney Tissues. *Pharmacological Research Communications* **1985**, 17, (2), 197-206.

Estrategias bioanalíticas en estudios metalómicos de fármacos de platino

M^a Milagros Gómez Gómez, Estefanía Moreno Gordaliza, M^a Luz Mena Fernández, M^a Antonia Palacios Corvillo, Benito Cañas Montalvo

Resumen: En este artículo se muestra el potencial que presentan las modernas estrategias bioanalíticas en estudios metalómicos de fármacos de platino. La combinación de técnicas de separación multidimensionales cromatográficas y/o electroforéticas con la espectrometría de masas atómica ICP-MS y molecular ESI-MS/MS se presenta como una valiosa alternativa en este tipo de estudios.

Palabras clave: Bioanálisis, metalómica, fármacos de Pt, cáncer, espectrometría de masas, separaciones multidimensionales.

Abstract: This article demonstrates the potential of modern bioanalytical strategies used in metallomic studies of platinum drugs. The combination of multidimensional chromatographic and/or electrophoretic separation techniques with atomic (ICP-MS) and molecular (ESI-MS/MS) mass spectrometry is presented as a valuable alternative in this type of studies.

Keywords: Bioanalysis, metallomics, platinum drugs, cancer, mass spectrometry, multidimensional separations.

Introducción

Ciertos complejos de platino son utilizados extensamente en el tratamiento de tumores sólidos. Así el cisplatino, (cis-diaminocloroplatino) se emplea en el tratamiento de cáncer de pulmón, testículos, ovarios, vejiga, cuello, cabeza, bazo y cérvix.¹ Puesto que los tumores se caracterizan por un aumento incontrolado de la proliferación celular, el ADN suele ser la diana de los fármacos antitumorales. El mecanismo de acción del cisplatino y de moléculas análogas implica la interacción coordinativa covalente del platino con las bases nitrogenadas del ADN, fundamentalmente guanina y adenina, produciendo

un entrecruzamiento en la misma cadena, o incluso, intercadena.¹ Los aductos de platino formados inciden en los procesos de replicación y transcripción, produciendo, finalmente, la muerte celular por apoptosis.² La clave del éxito en los tratamientos de quimioterapia estriba en destruir las células malignas sin causar un daño irreparable a las sanas.

Además de la reactividad descrita entre los fármacos del platino y las bases del ADN, la presencia de Pt (II) les proporciona la capacidad de unirse (principalmente a través de los grupos tiol) a otras biomoléculas como las proteínas del torrente sanguíneo (albúmina, transferrina, hemoglobina), los fosfolípidos de las membranas celulares, los aminoácidos cisteína y metionina, el oligopéptido glutatión (GSH) o las metalotioneínas (MTs).³ Entre las consecuencias más importantes de la formación de estos complejos Pt-biomolécula cabe destacar la resistencia al tratamiento debida al desarrollo de mecanismos de detoxificación por la reacción con MTs o GSH, así como los efectos tóxicos que aparecen durante el tratamiento (el principal y más limitante es la nefrotoxicidad), por lo que, a pesar de la potente actividad antitumoral del cisplatino, su uso clínico está limitado.

Aunque el mecanismo molecular de la nefrotoxicidad no está completamente establecido, se sabe que el cisplatino ocasiona daños estructurales en las células epiteliales de los túbulos del riñón con pérdida del borde en cepillo.⁴ Estos daños son dependientes de la dosis, por lo que su administración máxima está limitada a 100 mg/m².

Con objeto de disminuir los efectos tóxicos del cisplatino, y/o buscar compuestos alternativos que mejoraran o complementaran el espectro de su acción terapéutica, se desarrollaron otros fármacos análogos como el carboplatino (cis-diamino (1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino(II)) y el oxaliplatino (*trans*-L-1,2-diaminociclohexano oxalatoplatino (II)). Estos compuestos son activos frente al mismo tipo de cánceres y en ocasiones eficaces frente a tumores resistentes al cisplatino, y permiten dosis de hasta 300 mg/m² y 150 mg/m² de carboplatino y oxaliplatino respectivamente.⁵ No obstante, estos fármacos presentan otros efectos secundarios



M^a M. Gómez Gómez



E. Moreno Gordaliza



M^a L. Mena Fernández



M^a A. Palacios Corvillo



B. Cañas Montalvo

Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas.
Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid.
C-e: mmgomez@quim.ucm.es

Recibido: 15/06/2011. Aceptado: 02/12/2011.

como mielosupresión y neuropatías, y su eficacia en general es inferior. Actualmente, cabe destacar tres compuestos de Pt (II) que ofrecen un comportamiento prometedor: el nedaplatino (*cis*-diaminoglicolato-*O*, *O'*-platino (II)), aprobado para uso clínico en Japón, el lobaplatino (*cis*-1,2-diaminociclobutanoglicolato-*O*, *O'*-platino (II)), autorizado en China y el picoplatino (*cis*-aminodichloro (2-metilpiridina) platino (II)), en fase III de ensayos clínicos. La Figura 1 muestra la estructura química de estos fármacos.

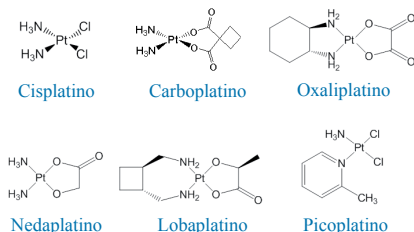


Figura 1. Estructura de los fármacos de platino más importantes.

Si se echa la vista atrás, el progreso en las terapias oncológicas con fármacos de platino ha sido exponencial desde la aprobación clínica del cisplatino en 1978. Sin embargo, hay todavía una falta de conocimiento profundo acerca del comportamiento de estos fármacos en el organismo, tanto de sus mecanismos de acción como de sus efectos tóxicos. Desde que estos fármacos entran en el torrente sanguíneo, tras su administración intravenosa, hasta que penetran en la célula y causan el efecto citotóxico, interaccionan con gran variedad de biomoléculas. Estas interacciones tienen que ver con fenómenos de transporte, de traspaso de la membrana celular, fenómenos de resistencia inducida e incluso con disfuncionalidades en ciertas biomoléculas que conducen a toxicidad.³ Por tanto, es de interés ahondar en el conocimiento de su mecanismo de actuación, así como en el análisis de las especies formadas por posibles interacciones entre estos fármacos, o sus derivados hidrolizados, y las diferentes biomoléculas que se encuentran en el organismo. De hecho, los avances logrados en los últimos años en análisis bio-inorgánico en el área de la metalómica, han contribuido de forma significativa a caracterizar la interacción de estas drogas con el ADN y con biomoléculas presentes en las células de la sangre, como la hemoglobina;⁶ en el plasma sanguíneo, como albúmina, transferrina e inmunoglobulinas;⁷ o en distintos componentes celulares, como el citoesqueleto, la membrana plasmática, vesículas³ y proteínas citoplasmáticas.⁸

Metodologías analíticas en metalómica

La metodología para el análisis bio-inorgánico en el campo de la metalómica ha evolucionado de forma notoria en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos instrumentos de espectrometría de masas y a su acoplamiento a técnicas separativas de gran resolución, aplicable tanto a la caracterización elemental como a la caracterización molecular de las especies administradas y/o formadas en el medio biológico.⁹ Mediante esta combinación de técnicas ha sido posible solucionar los principales problemas que entrañan estos análisis: concentraciones muy

bajas de los complejos formados, matrices muy complejas, transformación de especies, ruptura de los complejos metal-biomolécula, etc. Se requieren además métodos de preparación de la muestra eficaces, pero poco agresivos, con capacidad para purificar y preconcentrar las especies de interés sin romper los complejos que forman estos fármacos con las biomoléculas.

Cuando los complejos a estudiar están formados por metales y proteínas, la metodología analítica desarrollada se basa en la adaptación de la empleada hoy en día en el campo de la proteómica, constituyendo la base de la metodología metaloproteómica.¹⁰ Las técnicas utilizadas son, fundamentalmente, de separación de muestras complejas como la electroforesis en gel mono- o bi-dimensional, o la combinación de distintas separaciones cromatográficas en lo que se ha dado en llamar cromatografía multidimensional. La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)¹¹ es una técnica adecuada para el fraccionamiento de proteínas debido a la recuperación elevada que se obtiene. Sin embargo, la resolución obtenida no es especialmente buena, y cada una de las fracciones recogidas de una columna SEC puede contener un número indeterminado de proteínas si se trata de muestras biológicas de elevada complejidad. A pesar de esto, puede ser muy útil para desalar muestras, para resolver mezclas simples o como fraccionamiento previo a otras separaciones. No obstante, los acoplamientos de separaciones cromatográficas más utilizados combinan resolución con ortogonalidad, tal es el caso de la combinación de intercambio iónico con fase inversa.¹²

La espectrometría de masas molecular (MS) con técnicas de ionización blandas como electrospray (ESI) o desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) poseen un potencial analítico considerable en la determinación estructural de los complejos formados en metaloproteómica, ya que en muchos casos permiten que la estructura de las proteínas y los enlaces metal-biomolécula se conserven.⁹

En los últimos años el empleo de la espectrometría de masas elemental con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) como detector selectivo elemental y su acoplamiento a las técnicas cromatográficas, ha supuesto un gran avance en metalómica, principalmente debido a su elevada sensibilidad y carácter multi-elemental, aportando información tanto del metal o metaloide como de otros no-metales de gran importancia biológica como azufre o fósforo.⁹ Se han realizado con éxito separaciones bidimensionales de biomoléculas presentes en el extracto proteico de la fracción citosólica de riñón de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Esto se ha logrado mediante la combinación de SEC y cromatografía de intercambio iónico (IEC) con preconcentración en línea (en cabeza de columna) y acoplamiento a ICP-MS,¹³ encontrándose que los fármacos pueden estar unidos a una gran variedad de proteínas. Así se pone de manifiesto la necesidad de separaciones que proporcionen un gran poder de resolución, tales como μ HPLC, previo a la elucidación estructural de los complejos fármaco-proteína formados. En este sentido el acoplamiento μ HPLC-ICP-MS es una herramienta de gran ayuda para la detección específica y cuantificación de las biomoléculas con platino, cuya estructura se determina en paralelo mediante μ HPLC-ESI-MS.⁹

La baja concentración de los complejos metal-biomolécula en las muestras biológicas hace necesario el empleo de procedimientos de preconcentración previos al análisis. Entre los métodos más utilizados cabe destacar la evaporación de

disolventes a vacío mediante liofilización o *speed-vac*, la ultrafiltración por tamices moleculares o la concentración en cabeza de columna previamente a la separación cromatográfica.¹⁰ La focalización en línea se puede realizar mediante IEC o mediante cromatografía en fase inversa (RPC), con elevados factores de preconcentración y baja manipulación de la muestra. Con frecuencia, las fracciones cromatográficas concentradas presentan un elevado contenido salino, que es incompatible con ESI-MS, por lo que las fracciones deben ser desaladas mediante diálisis, ultrafiltración o microcolumnas de extracción en fase sólida.

En general, los procedimientos mencionados han de mantener la integridad de los complejos originales metal-biomolécula. Por ello, se requiere el empleo de inhibidores de proteasas, el control riguroso de las condiciones experimentales de pH, temperatura, salinidad, tiempo de almacenamiento de las muestras y conocer el efecto de los reactivos del procedimiento analítico para evitar la ruptura de los complejos, la transformación de las especies y la desnaturalización o agregación de proteínas.

Acumulación de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en organismos vivos y su distribución en fracciones celulares

Los estudios se realizaron en ratas Wistar con dosis farmacológicas de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino inyectadas por vía intraperitoneal. El platino acumulado en los órganos que en principio son susceptibles a un mayor daño, se determinó mediante ICP-MS. Los órganos en estudio fueron el riñón (el cisplatino produce nefrotoxicidad), hígado (órgano de acumulación), cerebro (el platino puede atravesar la barrera cerebral) y oído interno (el cisplatino produce ototoxicidad).¹⁴ Las principales conclusiones de los resultados de acumulación obtenidos en los diferentes órganos fueron las siguientes: el riñón fue el órgano que más platino acumuló a los tres días del tratamiento seguido por el hígado, el oído y el cerebro. Esto ocurrió independientemente del fármaco administrado. El máximo de acumulación para todos los fármacos se obtuvo a los siete días; a partir de este tiempo el contenido en platino empieza a disminuir en todos los órganos. Se observó que la capacidad de acumulación de los tres fármacos no es la misma. Así, las ratas tratadas con oxaliplatino presentaron mayor acumulación de platino en relación con la dosis administrada, seguidas de las tratadas con cisplatino y carboplatino. El hecho de que el oxaliplatino no sea el fármaco que en principio produce más toxicidad hace que no se pueda establecer una relación directa entre acumulación del elemento y toxicidad.

Los estudios realizados sobre la acumulación del cisplatino en diferentes partes del riñón de ratas muestran una acumulación unas ocho veces superior en la corteza en comparación con la médula renal. Estos datos concuerdan con el hecho de que, en la filtración del cisplatino en el riñón, la exposición al fármaco es nueve veces superior en el túbulo proximal respecto a la de la médula renal y del túbulo distal y colector. Como resultado, la corteza es la zona del riñón que presenta mayor daño, y por lo tanto en la que se han de centrar los estudios metalómicos.

Los estudios de distribución de los tres fármacos en diferentes fracciones celulares (núcleo, mitocondrias y citosol) y

subfracciones citosólicas de los distintos órganos, se realizaron mediante la preparación de extractos de tejidos en 10 mM Tris-HCl + 25 mM NaCl y posterior fraccionamiento por métodos de ultracentrifugación y ultrafiltración. En las distintas fracciones y subfracciones se analizó el contenido total de platino por ICP-MS. La distribución del platino en cada una de las fracciones celulares y citosólicas ofrece resultados muy similares para los tres fármacos. En riñón, la fracción citosólica, y en concreto la fracción inferior a 50 kDa, es la que presenta un mayor contenido del elemento. Por tanto esta fracción es la más interesante para abordar los estudios de interacción Pt-biomoléculas con objeto de descubrir qué compuestos podrían estar más relacionados con la nefrotoxicidad producida por platino. Precisamente, en este intervalo de masas se encuentran biomoléculas de notable interés como el GSH o las MTs, moléculas relacionadas con los mecanismos de detoxificación.

Estudio de la reacción *in vitro* entre cisplatino y biomoléculas citosólicas o proteínas del suero sanguíneo

El GSH es el principal responsable de mantener el estado redox en el interior celular, con un papel fundamental en la defensa contra el estrés oxidativo. Es también un importante

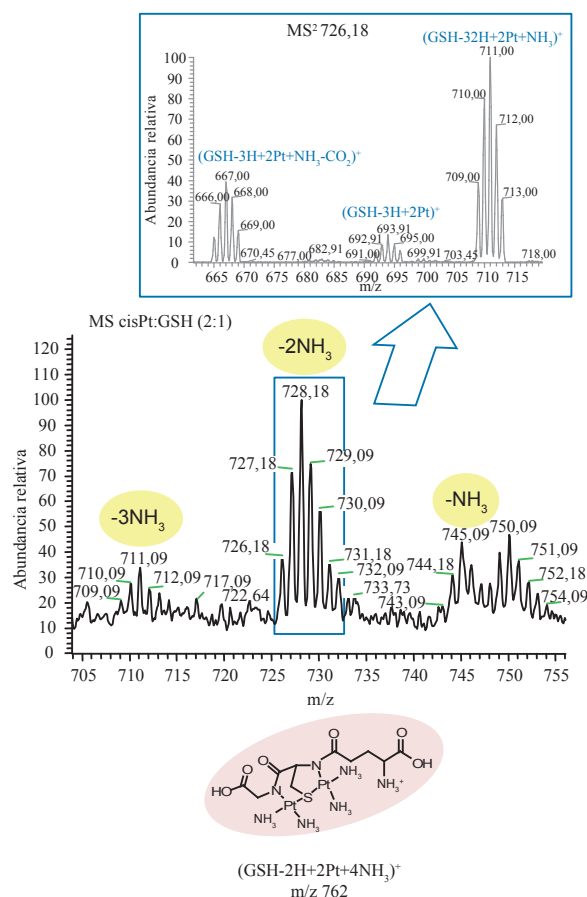


Figura 2. Espectro ESI-MS de una disolución de cisplatino 100 μ M incubada con GSH 50 mM durante 48 h, y espectro MS² del ión precursor a m/z 726.18–732.09, que corresponde a la estructura propuesta [GSH-3H+2Pt+2NH₃].

destoxificador de agentes carcinogénicos, por lo que cuando se encuentra en concentraciones altas en algunos tumores puede incrementar la resistencia a la quimioterapia. El cociente entre la especie reducida y la oxidada GSH/GSSG es un factor importante en la protección contra la apoptosis, proceso deseable como efecto de la administración de fármacos anticancerígenos como el cisplatino.⁵

Es sabido que el cisplatino en medio fisiológico puede encontrarse en su forma molecular original, en forma de dímero, o sustituir los cloros de su molécula por moléculas de agua u OH- dando lugar a diversos acuocomplejos que son las formas más reactivas para asociarse a las proteínas.

Para estudiar la reactividad del cisplatino con GSH, se incubaron ambas moléculas en las concentraciones farmacológicas Pt:GSH, que cabe esperar en el citosol celular (1:500). Posteriormente, la separación y detección de los aductos formados, se realizó mediante SEC-ICP-MS. Estos estudios han mostrado la formación, con distintas cinéticas, de diversos complejos cisplatino-GSH.⁸ No obstante, siempre permanece en el medio de reacción una cantidad

importante de distintas especies de cisplatino libre, que demuestra la reactividad limitada con GSH. El análisis mediante nESI-MS/MS de los complejos formados permitió la caracterización estructural de un complejo con estequiometría cisplatino:GSH 2:1 (Figura 2).⁸

Otras biomoléculas importantes del citosol celular con una gran capacidad de destoxificación de posibles contaminantes metálicos, son las MTs. Estas proteínas son capaces de coordinar metales tóxicos a sus múltiples residuos cisteínicos, desplazando de su estructura otros metales previamente coordinados. Se incubaron MTs que contenían Zn y Cd con 10 μ M de cisplatino en la proporción cisplatino:MTs 1:10 y las muestras fueron analizadas mediante SEC-ICP-MS. De forma análoga al estudio anterior, los resultados obtenidos han demostrando la gran afinidad que presentan estas proteínas por el cisplatino.⁸ En tan sólo 4h todo el fármaco se incorporó a las MTs, desplazando al Zn de las mismas, pero no al Cd (Figura 3). Este hecho pone de manifiesto la mayor estabilidad de los complejos de Pt²⁺ y Cd²⁺ con los residuos cisteínicos, en comparación con los formados con el Zn²⁺. En la incubación simultánea de cisplatino con GSH y MTs, como era de esperar, predomina el complejo cisplatino:MTs, aun en presencia de un gran exceso de GSH. Asimismo, citosoles de riñón de ratas tratadas con cisplatino y citosoles de ratas no tratadas que fueron incubados con el fármaco, muestran la presencia de los complejos anteriormente mencionados, tanto con GSH como con MTs, lo que indica una formación similar de los aductos biomolécula-cisplatino *in vivo* e *in vitro*.⁸

Para conocer la reactividad del cisplatino con las proteínas de la sangre que están implicadas en los procesos de transporte del fármaco al interior de las células, se realizaron incubaciones en condiciones fisiológicas de cisplatino con las proteínas de suero humano: albúmina (HSA), transferrina (TF) e inmunoglobulina G. El análisis de los aductos formados se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico acoplada a ICP-MS. Se observó la formación preferente del aducto cisplatino-HSA.⁷ Mucho menos intensa y más lenta fue la formación del aducto cisplatino-TF. La incubación de un suero sanguíneo humano con cisplatino corrobora que la especie platinada mayoritaria es el aducto cisPt-HSA y que esta interacción ocurre en gran extensión.

Aproximaciones proteómicas *bottom-up* y *top-down* en la caracterización estructural de proteínas ligadas a fármacos de platino

La identificación y caracterización de proteínas puede realizarse mediante dos posibles aproximaciones proteómicas conocidas como: *bottom-up* (de abajo a arriba) y *top-down* (de arriba a abajo). En la aproximación *bottom-up*, las proteínas de la muestra se separan mediante electroforesis bidimensional, y las manchas proteicas de interés se someten a digestión *in-gel* generalmente triptica. El posterior análisis de los péptidos obtenidos mediante MALDI-TOF-MS permite la identificación de la proteína sobre la base de su huella peptídica. Otra alternativa del *bottom-up* es la identificación de las proteínas a partir de los espectros de fragmentación de sus péptidos mediante ESI-MS/MS, y la asignación de las secuencias mediante búsqueda en las bases de datos de proteínas con ayuda de programas especializados. La aproximación pro-

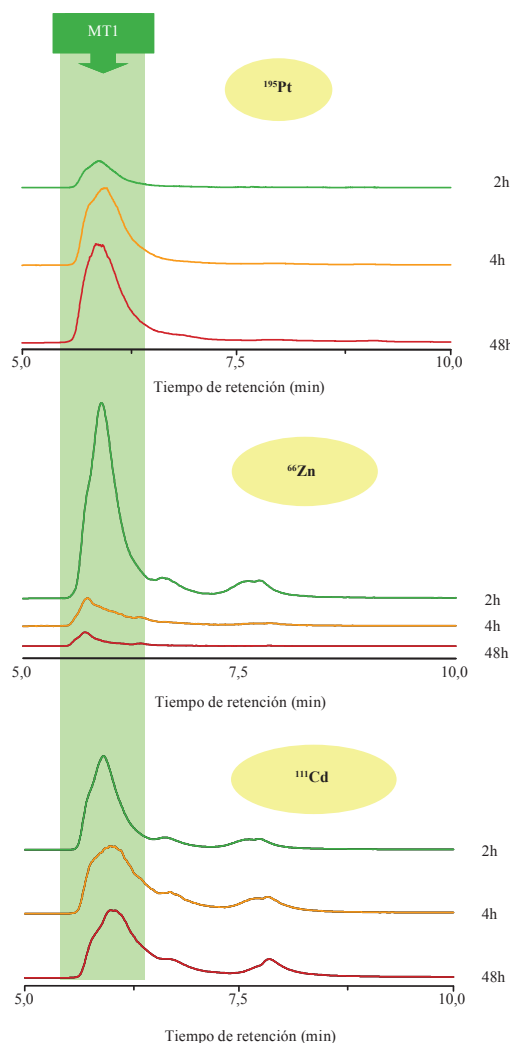
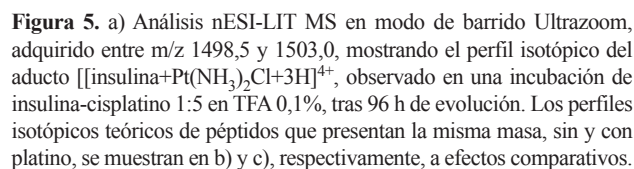


Figura 3. Cromatogramas SEC-ICP-MS de una disolución 10 μ M de MT de hígado de conejo incubada con cisplatino 1 μ M durante 2, 4 y 48 h. Iones monitorizados ¹⁹⁵Pt, ⁶⁶Zn y ¹¹¹Cd.

lisis preliminar mediante SEC-ICP-MS permitió detectar selectivamente los aductos de insulina-cisplatino en las incubaciones. Posteriores análisis mediante MALDI-TOF-MS y nESI-LIT-MS de las proteínas complejadas mostraron la presencia en las incubaciones de mono-, di- e incluso triaductos de platino (Figura 4). El modo *zoom scan* de la LIT presenta suficiente resolución para distinguir el perfil isotópico de los iones formados, lo que permitió localizar los iones que contenían platino (Figura 5). Los puntos de unión del platino en la insulina se identificaron mediante fragmentación disociación inducida por colisión (CID)-MSⁿ y fueron, en la cadena B, el aminoácido N-terminal y los residuos His5, His10 y Cys7.



Cadena B **FV**NQH**LC**GSHLVEALY**LV**CGERGFYTPKA
Cadena A **GIVE**Q**CC**ASVCSLYQLEN**YCN**

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la insulina bovina. En rojo se han marcado los aminoácidos que se han reconocido como capaces de coordinarse al platino tanto por la aproximación *top-down* como con la *bottom-up*. En azul se han resaltado los aminoácidos que ligan platino encontrados exclusivamente mediante la aproximación *bottom-up*.

de unión específicos del fármaco en una proteína. Los datos obtenidos con esta aproximación son más completos que los que se obtienen con la aproximación *top-down*, ya que los puntos de unión minoritarios del platino son más difíciles de asignar en los complejos espectros MS/MS de los aductos Pt-insulina intactos.

Cuando la proteína se incubó con cisplatino, después de una reducción de los puentes disulfuro con DTT, se demostró que las cisteínas libres presentan una reactividad muy superior a la de los grupos N-dadores (N-terminal, His). En caso de encontrarse implicadas las cisteínas en puentes disulfuro, la reactividad está disminuida, siendo comparable a la de otros aminoácidos.

En cuanto a la metodología analítica de la preparación de la muestra, se demostró la posibilidad de acelerar la digestión triptica de los aductos cisplatino-proteína mediante el empleo de una microsonda de ultrasonidos focalizados, permaneciendo el platino unido a los péptidos correspondientes. La información estructural fue similar, pero con un ahorro muy importante en el tiempo de digestión de 12 horas a 5 minutos.¹⁶

En la secuenciación de los péptidos con platino mediante ESI-MSⁿ se compararon las prestaciones de los métodos de fragmentación de péptidos mediante el método de fragmentación clásico, CID, y el más novedoso de disociación

por transferencia electrónica (ETD), aportando CID mejores resultados.¹⁶

Cuando se estudian proteínas de mayor masa que dan lugar a mezclas de péptidos más complejas, es necesaria la separación por HPLC previa a su análisis mediante ESI-MS/MS. Un ejemplo de los resultados obtenidos mediante el acoplamiento nLC-ESI-LIT-MS/MS se muestra en el cromatograma de la Figura 7, correspondiente a los aductos "mioglobina-cisplatino digeridos con tripsina".

Los estudios realizados con HSA y TF incubadas con cisplatino y análisis mediante ESI-Q-TOF muestran la formación de los aductos cisplatino-HSA de estequiometría 1:1 y cisplatino-Tf 1:1 y 1:2.⁷ Las digestiones tripticas de los aductos formados y análisis mediante μ HPLC-ICP-MS empleando una columna de fase inversa C₁₈ confirman la robustez del enlace cisplatino-proteína. El análisis estructural mediante μ HPLC-ESI-Q-TOF-MS permitió localizar péptidos con perfil isotópico de platino en cada uno de los digeridos. Resultados similares se obtuvieron con los digeridos de los complejos aislados de las muestras de suero sanguíneo incubadas con cisPt.

La metodología desarrollada en nuestro estudio, en principio se podría aplicar a la caracterización de complejos formados entre cualquier fármaco de platino y proteínas, y por extensión a cualquier metalodroga que forme complejos estables con biomoléculas.

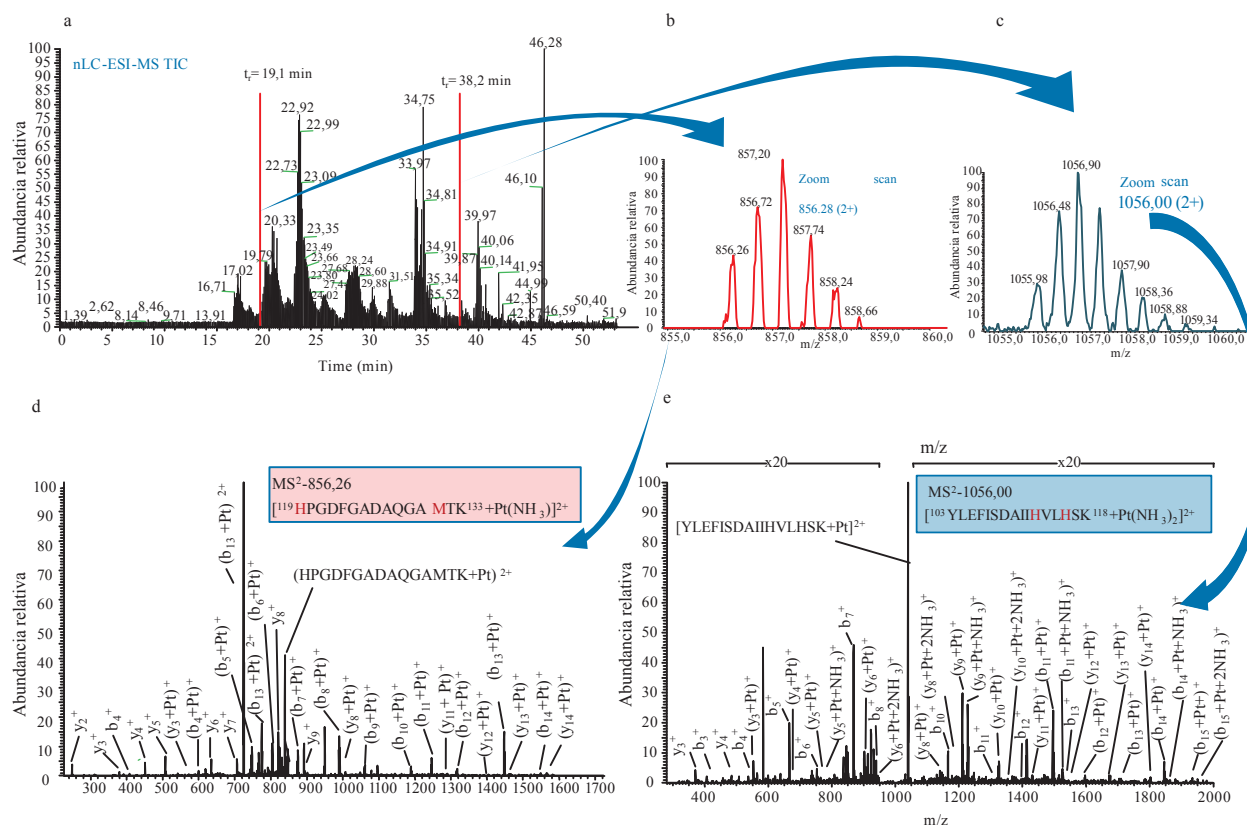


Figura 7. a) Cromatograma nLC-ESI-LTQ MS obtenido en modo TIC correspondiente a un digerido en disolución de aductos de mioglobina-cisplatino. A tiempos de retención de 19,1 min y 38,2 min se reconocieron sendos péptidos con platino a tenor de su perfil isotópico observado durante barridos en modo zoom, a m/z 856,28 (b) y a 1056,0 (c), respectivamente. Los espectros de fragmentación (CID-MS²) de estos iones permitieron su identificación y la localización de los puntos de unión del Pt en ellos (d y e), como los residuos de His y Met (marcado en rojo en su secuencia).

Separaciones multidimensionales de proteínas ligadas a platino

En muestras complejas, tales como extractos de células o tejidos, pueden encontrarse muchas proteínas ligadas al platino que no pueden ser separadas adecuadamente incluso mediante la combinación de procedimientos cromatográficos consecutivos. Además, la utilización de cromatografía en fase inversa, que puede proporcionar una gran resolución, puede no ser adecuada para muchas proteínas, que quedan retenidas irreversiblemente. Sin embargo, cuando se trabaja con péptidos, las posibilidades de separación y recuperación aumentan considerablemente. En este caso, la cromatografía en fase inversa es muy adecuada para su separación, obteniéndose recuperaciones generalmente muy buenas. Por esto, el análisis y caracterización de muestras muy complejas de proteínas tiende a hacerse actualmente después de su digestión triptica, tras la cual los péptidos producidos se separan mediante dos o más procesos cromatográficos siguiendo una metodología conocida como identificación de proteínas mediante separación multidimensional, MudPIT, en sus siglas en inglés.¹⁷

Una alternativa a las técnicas cromatográficas, es la electroforesis bidimensional (2-DE) aplicada directamente a los extractos de proteínas. La 2-DE consiste en dos separaciones electroforéticas ortogonales, la primera mediante isoelectroenfoque (IEF) y la segunda mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La combinación de estas dos técnicas electroforéticas presenta un alto grado de resolución y puede utilizarse a escala micro-preparativa. Es así posible la separación e identificación de hasta centenares, e incluso miles de proteínas, por lo que es ampliamente utilizada en proteómica, siendo, en principio, una buena alternativa en metaloproteómica. No obstante, para la separación de proteínas unidas a platino, se hace necesaria la utilización de reactivos que no afecten a la integridad del enlace Pt-proteína. Algunos reactivos habitualmente utilizados para IEF o SDS-PAGE, como son la tiourea o los agentes reductores, deben restringirse o utilizarse con precaución.¹⁸ Los estudios se realizaron con proteínas modelo como la HSA, TF, citocromo C, anhidrasa carbónica y mioglobina incubadas con cisPt¹⁸ en un primer estudio de SDS-PAGE. Al finalizar la electroforesis, los minigeles (10 cm x 10 cm) se cortaron en pequeñas bandas de unos 15 x 7,5 mm, se digirieron con HNO₃ y H₂O₂, seguido de agua regia y HCl, y el contenido de platino se analizó por ICP-MS. Los mejores resultados se obtuvieron en condiciones no-reductoras (en ausencia de BME o DTT, donde las proteínas con platino se separan en bandas estrechas en el intervalo 0-3-2,0 µg, y las recuperaciones de platino son cuantitativas. Los límites de detección obtenidos (2,4-14 pg de Pt) son adecuados para su aplicación a muestras biológicas. Estudios paralelos realizados con carbo- y oxaliplatino en las condiciones seleccionadas anteriormente aportaron resultados similares en el caso del oxaliplatino. Sin embargo, el carboplatino muestra pérdidas significativas del platino unido a las proteínas, por lo que las separaciones electroforéticas de las proteínas ligadas a este fármaco se han de realizar en condiciones nativas.

En el segundo estudio, sobre las proteínas separadas por SDS-PAGE se realizan de forma secuencial procesos de fijación, tñido y destñido del gel y se realiza la digestión triptica

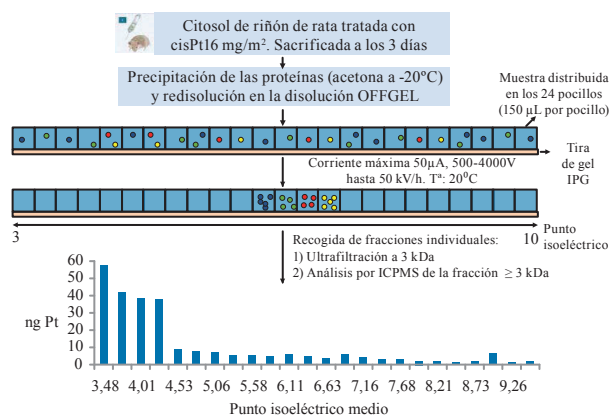


Figura 8. Esquema de la separación mediante isoelectroenfoque OFFGEL en condiciones no reductoras de un citosol de riñón. Perfil de Pt proteico obtenido mediante análisis ICP-MS de las fracciones líquidas recogidas.

in-gel de las bandas seleccionadas. Los resultados obtenidos para los digeridos *in-gel* de las proteínas seleccionadas incubadas con cisplatino y analizadas por nHPLC-ESI-MS/MS indican que el proceso de digestión *in-gel* es también adecuado para mantener los enlaces Pt-proteína, y por tanto para la caracterización estructural de estos complejos y sus puntos de unión.^{18,19}

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica de isoelectroenfoque en disolución (sIEF, conocida como OFFGEL IEF), en la cual las proteínas separadas se recogen en disolución en unos pocillos situados encima de la tira de gel IEF. La ventaja es que mediante este procedimiento se simplifica el tratamiento de la muestra para su análisis posterior mediante nLC-ESI-MS. Los ensayos OFFGEL IEF realizados con proteínas modelo ligadas a cisplatino muestran buenas separaciones y recuperaciones cuantitativas prescindiendo del uso de tiourea y en condiciones no reductoras.¹⁸ Por otra parte, se ha demostrado la utilidad del OFFGEL IEF para la separación de proteínas de citosoles de riñón de ratas tratadas con cisplatino.¹⁸ Se observa que el platino no se distribuye de forma uniforme a través de los 24 pocillos del sistema, sino que la mayor parte del platino ligado a proteínas se localiza en 4 pocillos (Figura 8), lo que facilita la posterior identificación estructural mediante nLC-ESI-MS/MS de las fracciones enriquecidas en platino.

Distribución de las proteínas unidas a platino mediante el análisis de geles de electroforesis por LA-ICP-MS

La combinación de la electroforesis, SDS-PAGE o 2D, con ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS, LA-ICP-MS, es una herramienta muy prometedora para la obtención de los mapas de distribución de metales o heteroátomos ligados a proteínas, habiéndose aplicado con éxito a la detección de proteínas fosforiladas²⁰ o ligadas a Zn o Cd.²¹ En nuestro caso, el empleo de las técnicas 2-DE (IEF seguido de SDS-PAGE) junto con LA-ICP-MS permite el aislamiento y localización rápida y precisa de las bandas (1D) o puntos (2D) donde se encuentren las proteínas ligadas a platino. Posteriormente los trozos de gel que contienen Pt pueden cortarse, digerirse con tripsina, y las proteínas platinadas identificarse mediante nLC-ESI-MS/MS de los péptidos producidos (Figura 9).

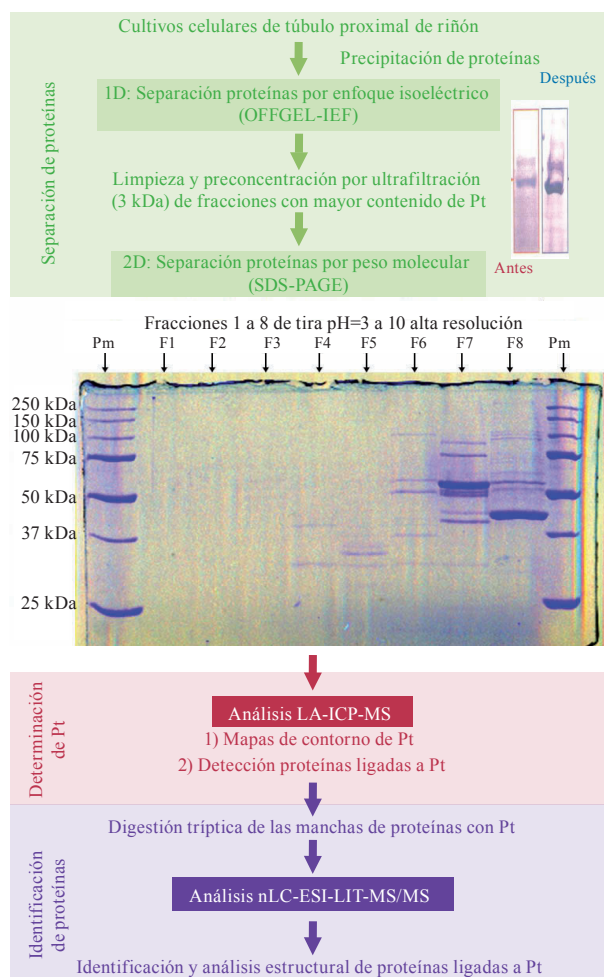


Figura 9. Esquema de la separación de proteínas citosólicas por electroforesis bidimensional, detección de las bandas con Pt por LA-ICP-MS e identificación estructural de las proteínas ligadas a Pt mediante nLC-ESI-LIT-MS/MS. Los intervalos de pH de las diferentes fracciones son: F1 (3,35-3,61), F2 (3,61-3,88), F3 (3,88-4,14), F4 (4,14-4,40), F5 (4,40-4,66), F6 (4,66-4,93), F7 (4,93-5,19) y F8 (5,19-5,45).

La aplicabilidad de esta metodología a proteínas ligadas a platino se ha evaluado primero con una mezcla de proteínas incubadas *in vitro* con cisplatino y a continuación con citosoles de cultivos de células epiteliales del túbulo proximal de riñón (RPTECs) de cerdo en miniatura incubados con cisplatino. Con objeto de obtener la distribución de las proteínas con platino en el gel y su abundancia relativa, se crearon mapas de contorno de platino mediante el programa MATLAB. Se observa, como era de esperar, que no aparece platino en todas las manchas donde hay proteínas, y que la intensidad de la señal de platino es independiente de la concentración de proteína, lo que indica cierta especificidad del fármaco en sus interacción con las proteínas.²² Estos resultados son muy prometedores en términos de selectividad, sensibilidad y rapidez del análisis.

Conclusiones

Los avances logrados en los últimos años en análisis bio-inorgánico han permitido abordar estudios metalómicos *in vivo* de fármacos de platino. El empleo de

técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas en combinación con técnicas de espectrometría de masas atómica y molecular constituyen herramientas complementarias para la detección e identificación sensible y selectiva de los complejos fármaco-proteína formados en los medios biológicos y muestras clínicas durante el tratamiento. Cabe esperar que en un futuro este tipo de estrategias sean de gran ayuda en estudios de distribución, metabolismo, efectos tóxicos, etc. de metalodrogas en general.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Ciencia e Innovación en el proyecto CTQ2008-04873.

Bibliografía

- Y. Jung, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2007**, *107* (5) 1387–1407.
- R. C. Todd, S. J. Lippard, *Metallomics*. **2009**, *1*, 280–291.
- K. Wang, J. Lu, R. Li, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *151*, 53–88.
- E. Cvitkovic, *Cancer Treat. Rev.* **1998**, *24*, 265–281.
- J. Cassidy, *Int. J. Clin. Pract* **2000**, *54*, 399–402.
- J. Peng, R. Mandal, M. Sawyer, X. F. Li, *Clin. Chem.* **2005**, *51* (12), 2274–2281.
- D. Esteban-Fernández, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, M. M. Gómez-Gómez, M. A. Palacios, A. Sanz-Medel, *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2008**, *23*, 378–384.
- D. Esteban-Fernández, B. Cañas, I. Pizarro, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1113–1121.
- J. Szpunar, *The Analyst (CR)* **2005**, *130* (4), 442–465.
- D. Esteban-Fernández, E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *Metallomics*. **2010**, *2*, 19–38.
- C. Casiot, J. Szpunar, R. Lobinski, M. Potin-Gautier, *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 645–650.
- A. Rodríguez-Cea, M. R. Fernández de la Campa, E. Blanco González, B. Andón Fernández, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.* **2003**, *18*, 1357–13664.
- D. Esteban-Fernández, M. M. Gómez-Gómez, B. Cañas, J. M. Verdager, R. Ramírez, M. A. Palacios, *Talanta* **2007**, *72*, 768–773.
- D. Esteban-Fernández, J. M. Verdager, R. Ramírez, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *J. Anal. Toxicol* **2008**, *32* (2), 140–146.
- E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, M. Gómez-Gómez, *Anal. Chem.* **2009**, *81* (9), 3507–3516.
- E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *Analyst* **2010**, *135* (6), 1288–1298.
- QC Ru, LA Zhu, RA Katenhusen, J. Silberman, M. Liebman, CD Shriver, *J. Chromatogr. A.* **2006**, *1111*, 175.
- M. L. Mena, E. Moreno-Gordaliza, I. Moraleja, B. Cañas, M. M. Gómez-Gómez, *J. Chromatogr. A.* **2011** *1218* (9), 1281–1290.
- E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, M. M. Gómez-Gómez, *Talanta*, **2012**, *88*, 599–608.
- A. Ventachalam, C. U. Koehler, I. Feldmann, P. Lampen, A. Manz, P. H. Roos, N. Jakubowski, *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1023–1032.
- M. R. B. Binet, R. Ma, C. W. McLeod, R. K. Poole, *Anal. Biochem.* **2003**, *318* (1) 30–38.
- E. Moreno-Gordaliza, D. Esteban-Fernández, C. Giesen, K. Lehmann, A. Lázaro, B. Cañas, A. Tejedor, C. Scheler, N. Jakubowski, M. W. Linscheid, M. Gómez-Gómez, *Proceedings of the European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Zaragoza (Spain)*, **2011**, *114* (OC-53).